Лабораторные методы диагностических исследований (аналитические методы)

Введение

- Лабораторные исследования – самые массовые исследования в здравоохранении.
- От 30 до 45% случаев заболеваний не могут быть правильно диагностированы без данных объективного обследования, среди которых результаты клинических лабораторных исследований составляют от 60 до 80%. Ежегодно только в ЛПУ системы Министерства здравоохранения клинические лаборатории выполняют свыше 2,546 миллиарда лабораторных исследований.
- Если прибавить к этому ведомственные, академические, частные и др. КДЛ, то эту цифру необходимо увеличить, по крайней мере, в 1,5 раза.

Современная клиническая лабораторная диагностика (лабораторная диагностика) – бурно прогрессирующая медицинская диагностическая специальность, выполняющая исследования биоматериала человеческого организма с использованием морфологических, биохимических, иммунологических, молекулярно-биологических, бактериологических, генетических, цитологических, токсикологических, вирусологических и других методов.

Клиническая лабораторная диагностика

Клиническая лабораторная диагностика (КЛД)- медицинская диагностическая специальность, состоящая из совокупности исследований in vitro биоматериала человеческого организма, основанных на использовании ряда специфических методов, сопоставления результатов этих методов с клиническими данными и формулирования лабораторного заключения.

При КЛД выполняются исследования биоматериала человеческого организма с использованием морфологических, биохимических, иммунологических, молекулярно-биологических, бактериологических, генетических, цитологических, токсикологических, вирусологических и других методов.

Основная задача - получение объективных данных о состоянии здоровья и нездоровья отдельно взятого пациента, выделенной группы или населения региона в целом.

Клиническая лабораторная диагностика

Клиническая лабораторная диагностика - комплексная медицинская специальность.

Основные субдисциплины:

Клиническая биохимия Гематология Цитология Лабораторная генетика Общеклинические исследования Иммунология	Изосерология Молекулярная биология Бактериология Паразитология Вирусология Токсикология Коагулология

Основной носитель информации - биоматериал человека, исследуемый in vitro в лабораторных условиях.

Основные разделы клинической лабораторной диагностики

- Химико-микроскопическое исследование биологических материалов
- Гематологические исследования
- Исследования системы гемостаза
- Биохимические исследования
- Микробиологические исследования

- Иммунологические исследования

- Исследование реологических свойств крови
- Цитохимические исследования
- Лекарственный мониторинг

- Иммуноферментный анализ
- Методы молекулярной диагностики

Химико-микроскопическое исследование биологических материалов

Моча
- физические свойства
- химическое исследование
- микроскопия осадка

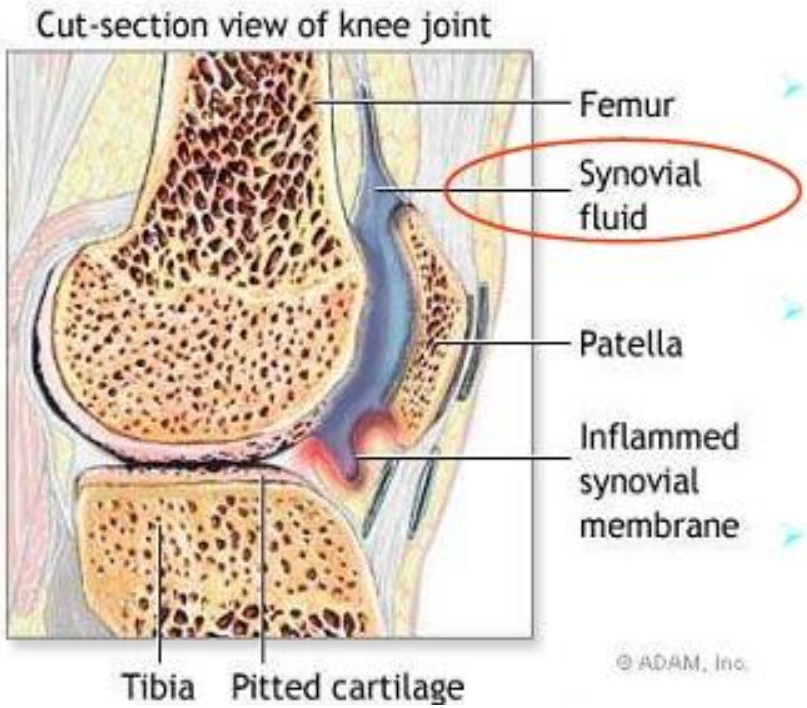
Кал
- физические свойства
- химическое исследование
- микроскопия
- обнаружение простейших
- обнаружение гельминтов

Желудочная секреция

Экссудаты
- физико-химические свойства
- Микроскопия

Спинномозговая жидкость
- физические свойства
- химическое исследование
- микроскопия

Синовиальная жидкость



Асцитная жидкость

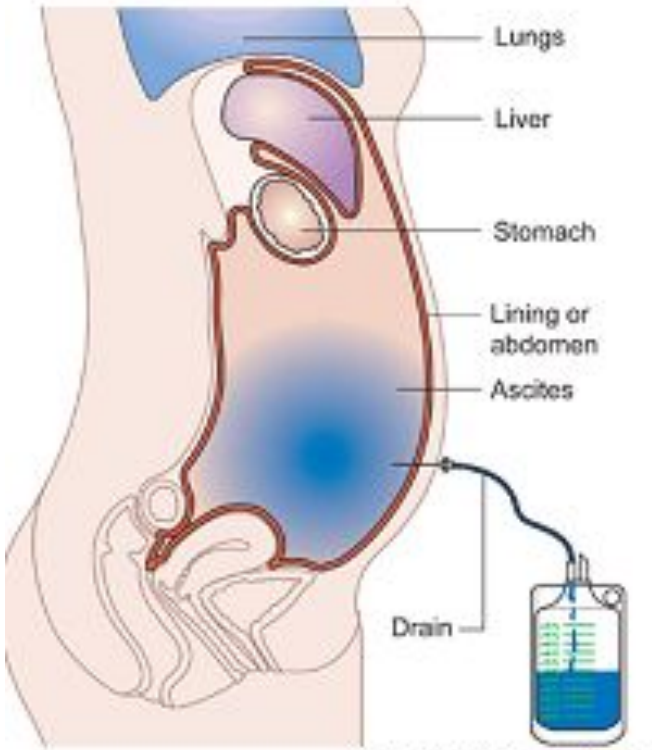
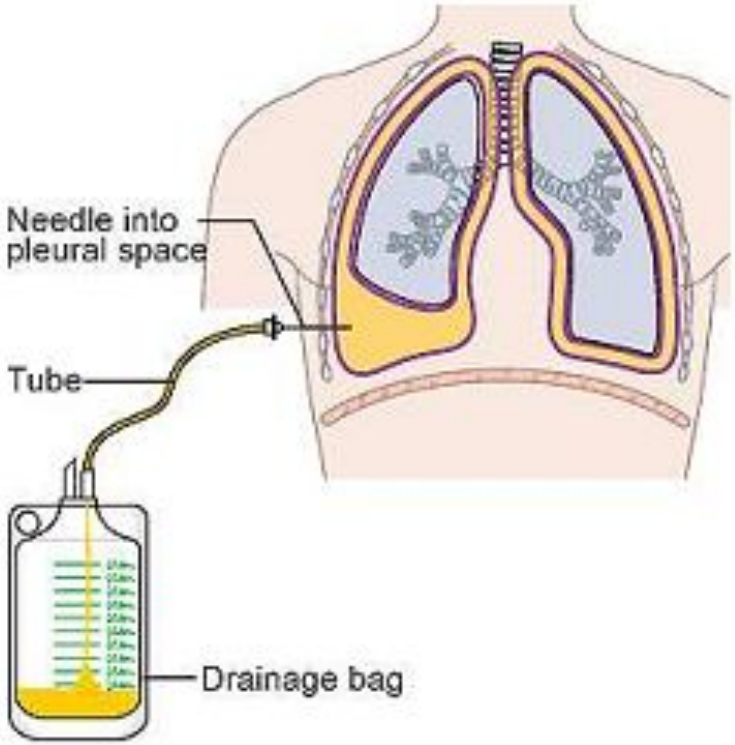
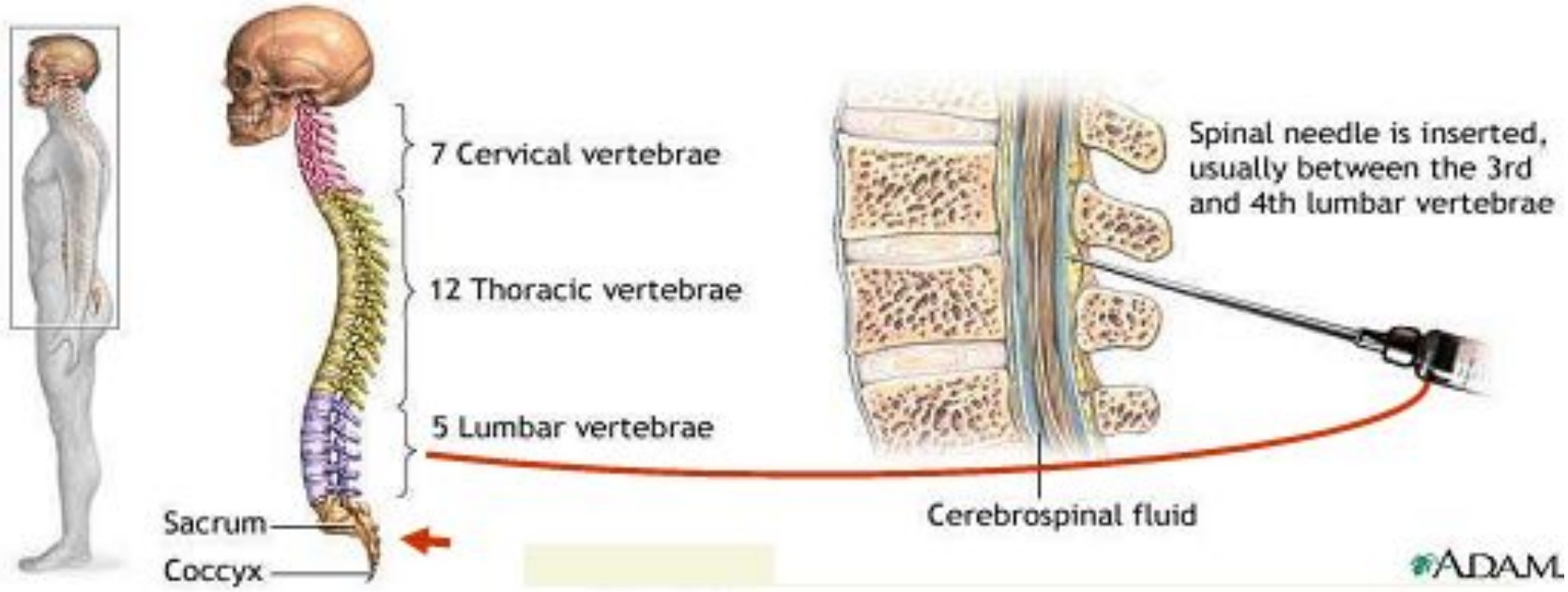


Diagram showing fluid (ascites) being drained from the abdomen
Copyright © CancerHelp UK

Плевральная жидкость



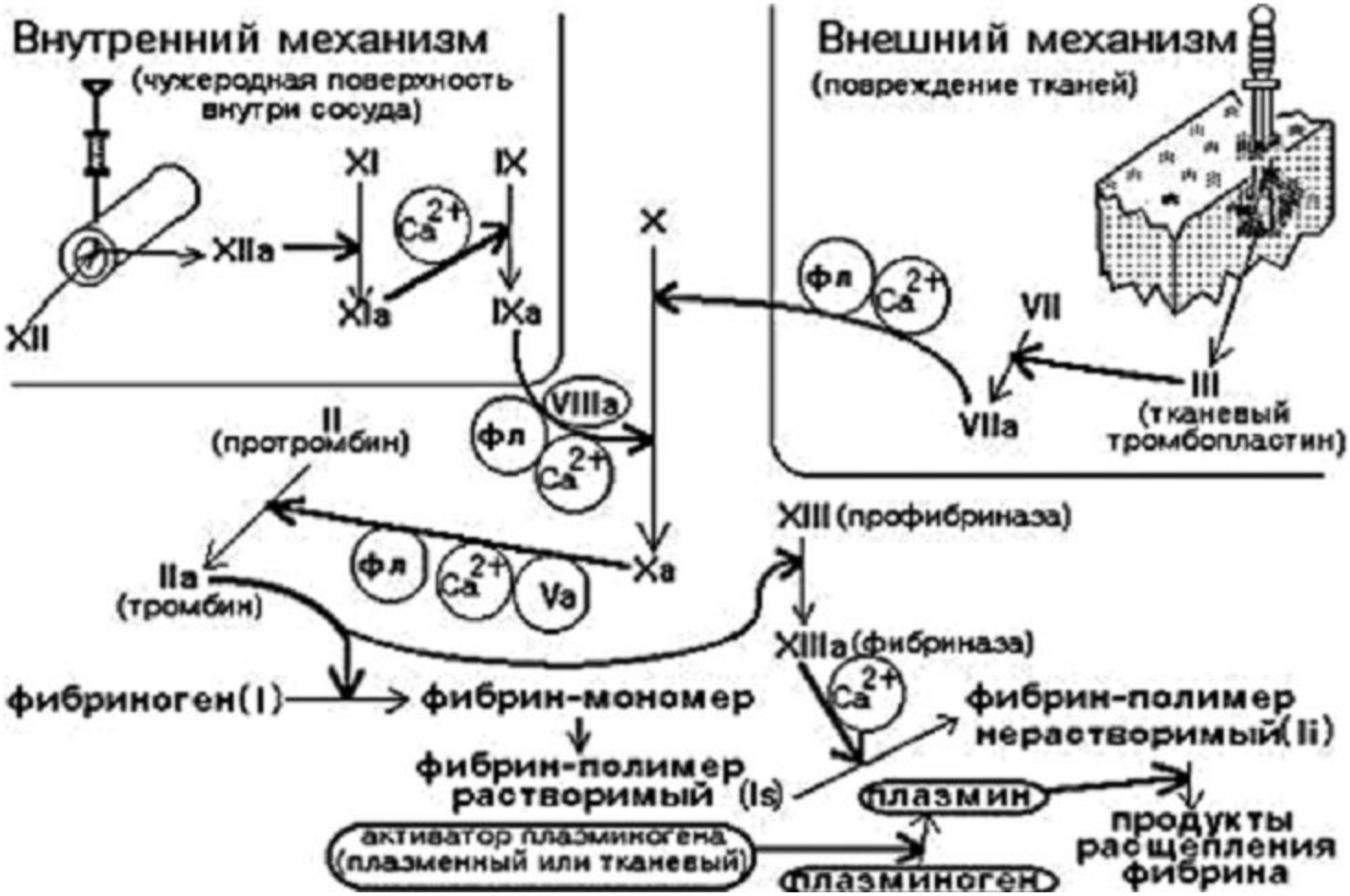
Спинномозговая жидкость



Методы исследования системы гемостаза:

- Исследование сосудисто-тромбоцитарного (первичного) гемостаза;
- Исследование свертывания крови (коагуляционный гемостаз);
- Исследование фибринолитической системы крови

Система гемостаза:



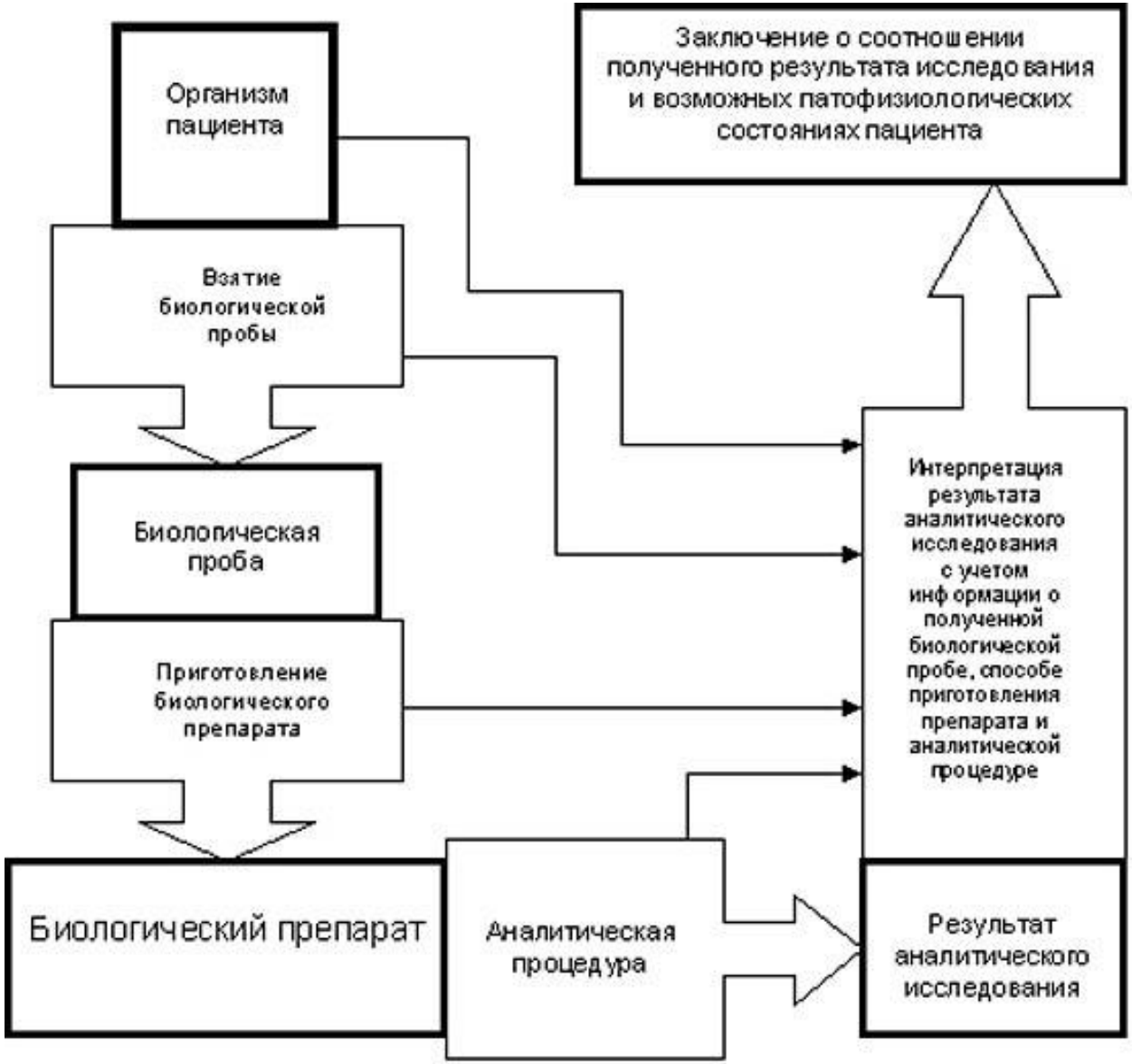
Методы клинической биохимии

- Белки и белковые фракции
- Ферменты и изоферменты
- Низкомолекулярные азотистые вещества
- Показатели пигментного обмена
- Глюкоза и метаболиты углеводного обмена
- Липиды, липопротеины и аполипопротеины
- Гормоны
- Неорганические вещества (натрий, калий, показатели метаболизма железа)
- Кислотно-основное состояние

Классификация медицинских изделий

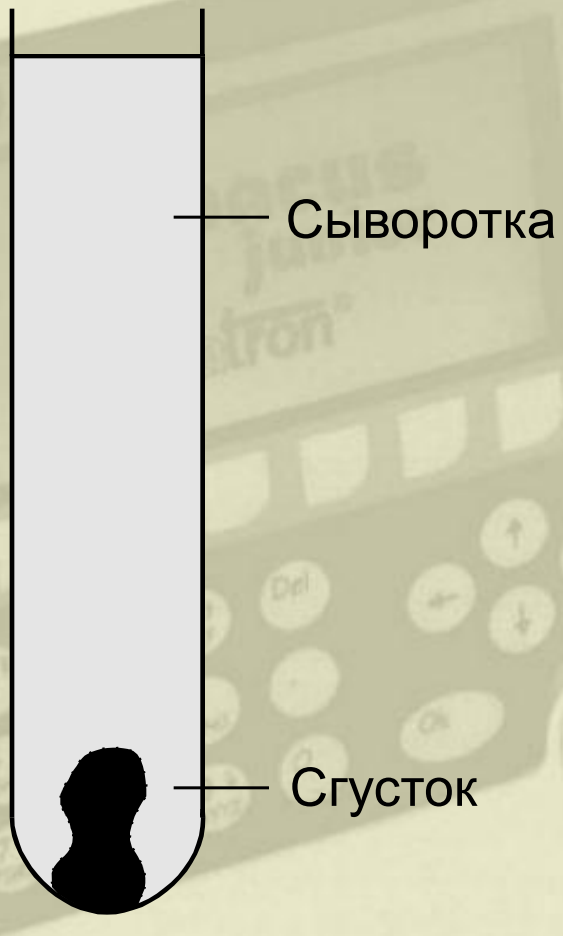
- для общих клинических исследований;
- для биохимических исследований;
- для определения кислотно-щелочного состояния и газов крови;
- для исследований электролитного состава крови и мочи;
- для иммунологических исследований;
- для серологических исследований;
- для морфологических исследований;
- для цитологических исследований

Цикл производства лабораторного продукта

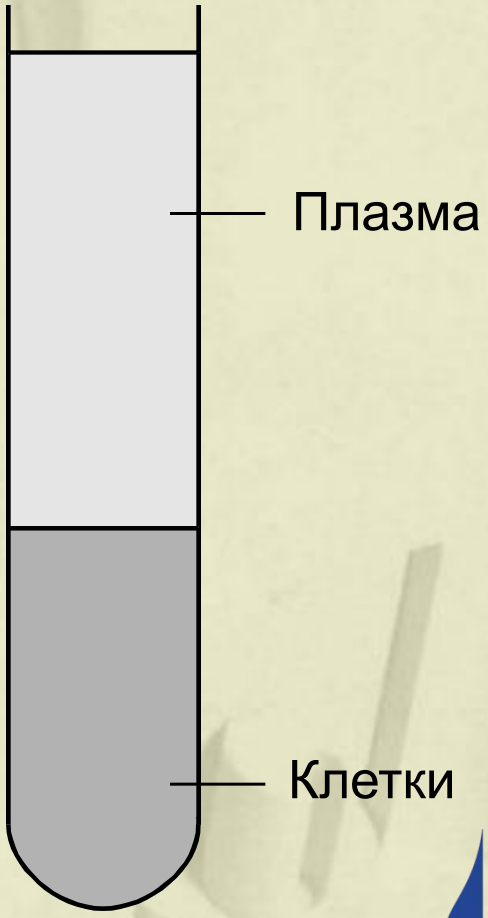

Организм пациента
Заключение о соотношении полученного результата исследования и возможных патофизиологических состояниях пациента
Взятие биологической пробы
Биологическая проба
Интерпретация результата аналитического исследования с учетом информации о полученной биологической пробе, способе приготовления препарата и аналитической процедуре
Приготовление биологического препарата
Биологический препарат
Аналитическая процедура
Результат аналитического исследования

Пробы крови

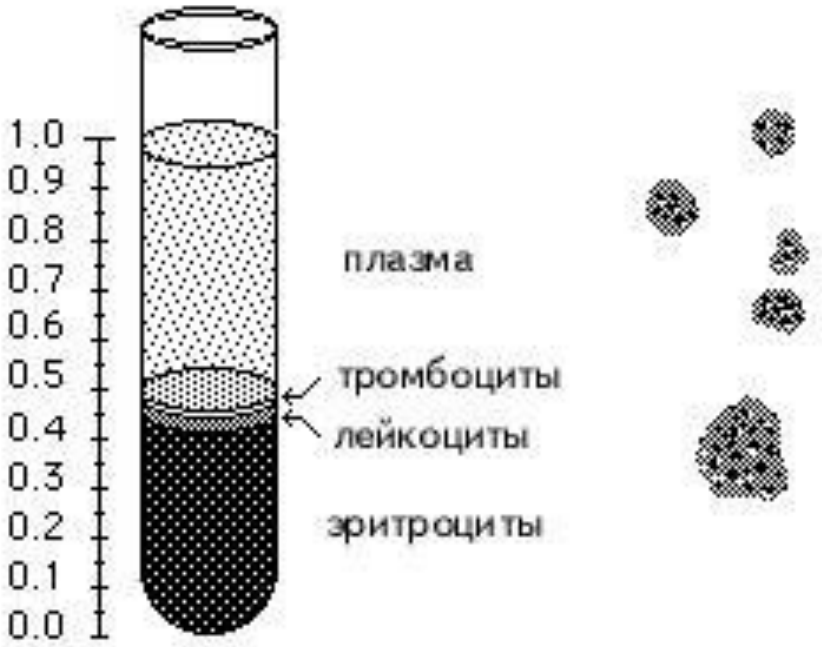
Без антикоагулянта



С антикоагулянтом ЭДТА



Разделение крови



Пробоподготовка крови

Так как между сбором проб и их анализом обычно проходит какое-то время, необходимо предупредить свертывание крови с помощью антикоагулянта для предотвращения образования больших групп клеток в сгустках и закупорку такими сгустками апертуры камеры измерения.

Выбор антикоагулянта очень важен, так как некоторые антикоагулянты влияют на форму и размер клеток крови. Обычно только один антикоагулянт рекомендуется для использования с гематологическими анализаторами – это **EDTA (ЭДТА, трилон Б)**, предпочтительнее соль натрия или калия.

Следует соблюдать осторожность при использовании самостоятельно приготовленных контейнеров с ЭДТА. Если контейнер не наполнен до нужного уровня, отношение EDTA к цельной крови будет слишком большим, вследствие чего из-за повышения осмотического давления происходит сжатие эритроцитов (RBC).

Diatron®

Пробы крови

Обычно рекомендуется использование пробирок для проб с необходимым количеством ЭДТА, произведенных фабричным способом, также необходимо наполнять их кровью до указанного на них уровня.

Отношение EDTA к цельной крови не должно превышать 3 мг/мл.

Концентрация ЭДТА: 2,0 мг на 1 мл цельной крови
(допустимый разброс: 1,5–3,0 мг/мл).

Пример соотношения:

Капиллярная кровь: 100 мкл крови + 10 мкл 2% раствора ЭДТА
Венозная кровь: 10 мл крови + 100 мкл 20% раствора ЭДТА
Сразу перемешать!

Стабильность проб:

- при комнатной температуре – 4 часа
- при 2-8°C – сутки

Diatron®

Взятие крови на общий анализ

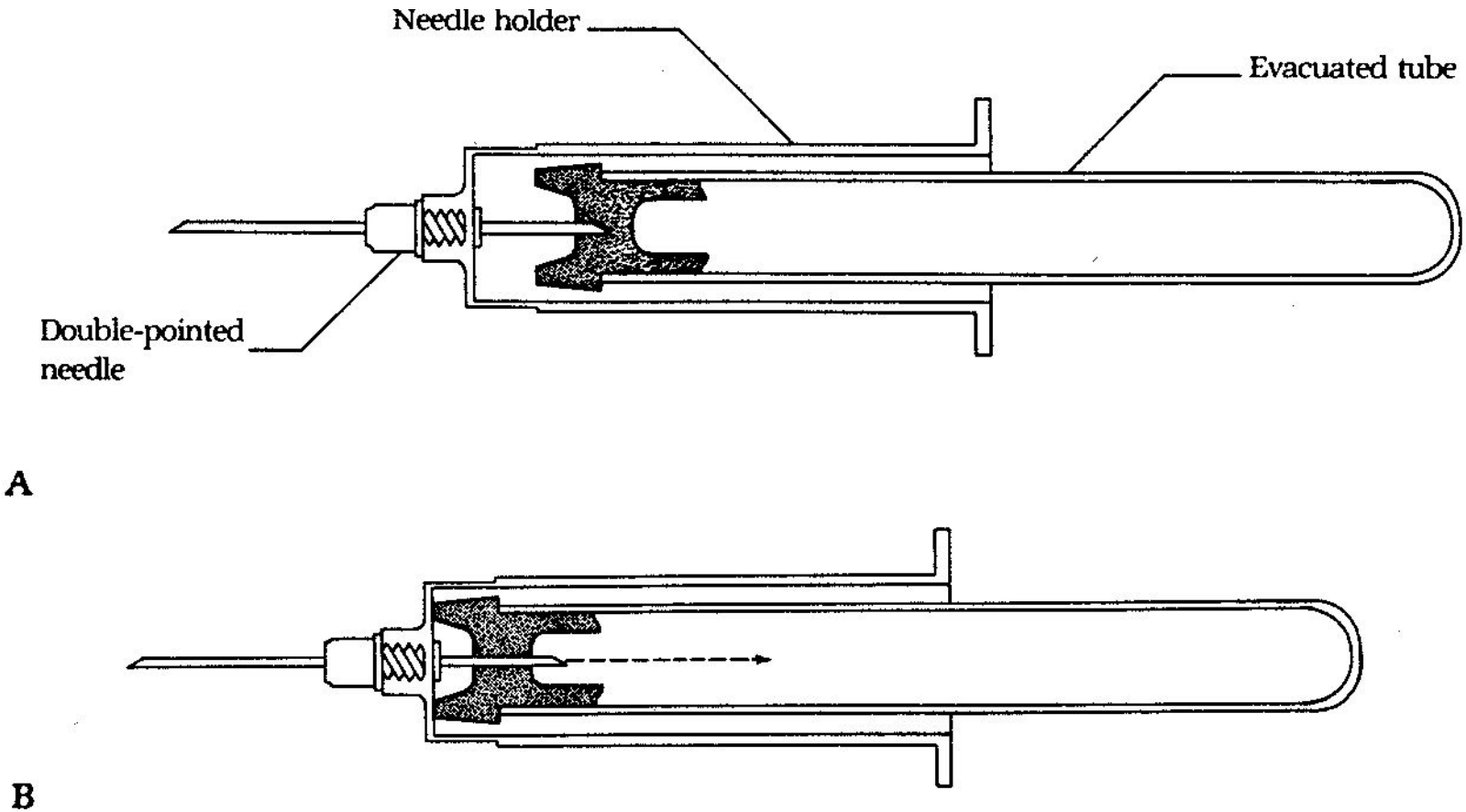
- **Предпочтение отдается взятию венозной крови**
- **В качестве стабилизатора используются калиевые соли ЭДТА ($К_2$ЭДТА или $К_3$ЭДТА) в конечной концентрации 1,6 – 2,2 мг/мл**

  ICSH* и NCCLS отдают большее предпочтение K_2 EDTA (перед K_3 EDTA), так как K_2 EDTA обеспечивает большую стабильность размера клеток крови и не разбавляет образец.**
- **При правильном взятии разницы результатов между венозной и капиллярной кровью быть не должно**

***Inernational Council for Standardisation in Haematology -**

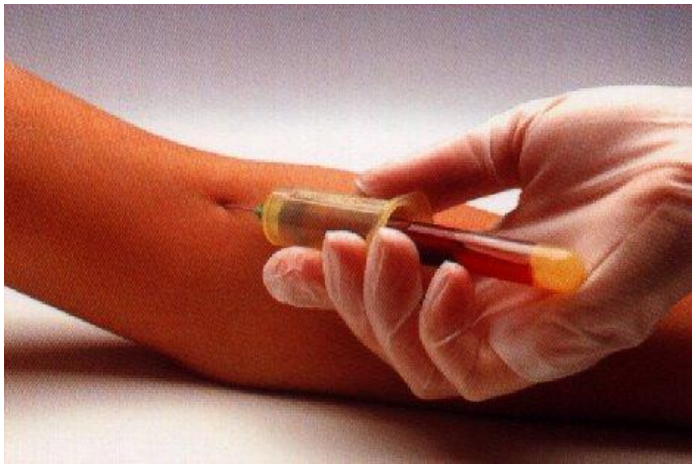
Международный комитет по стандартизации в гематологии

**** National Committee for Clinical Laboratory Standards - Национальный комитет по стандартизации в клинической лаборатории (США)**



Вакуумные пробирки

Взятие крови



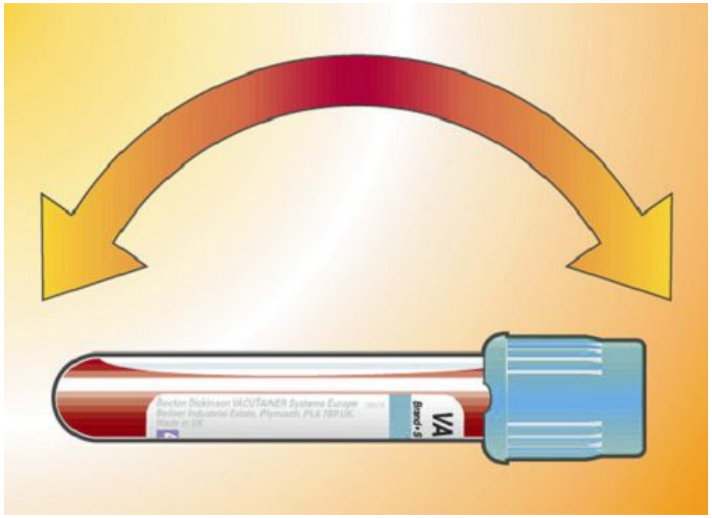
- При переливании крови в пробирку в игле создается давление, увеличивающее вероятность гемолиза и разбрызгивания крови
- В момент переливания крови в пробирку она подвергается воздействию окружающей среды, что приводит к нарушению целостности и стерильности пробы
- Взятие крови с помощью шприца всегда подразумевает возможный контакт с кровью пациента, что может привести к инфицированию
- Для различных тестов необходимо предварительно готовить несколько пробирок с разными реагентами
- Традиционный метод требует от медсестры тщательного дозирования крови в пробирке для соблюдения точного соотношения кровь/реактив

- Тщательно дозированный объем вакуума обеспечивает точное соотношение кровь/ реагент в пробирке
- Это система, позволяющая быстро и качественно взять кровь у пациента.
- Время забора сокращается на 30-50%, при этом кровь в пробирке не подвергается гемолизу
- Одной венопункции достаточно для отбора крови в несколько пробирок

Венозная кровь

Последовательность наполнения пробирок:

1. **Кровь без антикоагулянтов - для получения сыворотки, используемой при биохимических и серологических исследованиях;**
2. **Кровь с цитратом - для получения плазмы, используемой при коагулологических исследованиях;**
3. **Кровь с гепарином - для получения плазмы, используемой при клинико-химических исследованиях;**
4. **Кровь с K_2ЭДТА - для получения цельной крови, используемой для гематологических исследований**



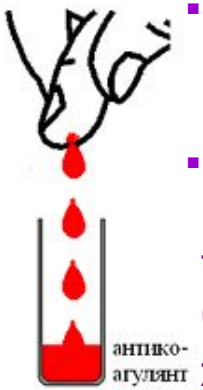
Капиллярная кровь

Капиллярную кровь рекомендуется брать в следующих случаях:

- при ожогах, занимающих большую площадь поверхности тела пациента;
- при наличии у пациента мелких или труднодоступных вен;
- при выраженном ожирении пациента;
- при установленной склонности к венозному тромбозу;
- у новорожденных.

Основные проблемы и рекомендации :

- При прохождении через поврежденную ткань активируется свертывание крови, поэтому длительность взятия крови является критически показателем
- При взятии крови в антикоагулянт не допускается стекание крови по коже пальца, по стенке пробирки и любой другой поверхности, так как мгновенно происходит контактная активация процесса свертывания.
- Кровь самотеком из прокола должна попадать прямо в антикоагулянт, перемешиваясь с ним.
- Нельзя выдавливать кровь из пальца во избежание спонтанной агрегации тромбоцитов и попадания в пробу большого количества межтканевой жидкости (тромбопластина).



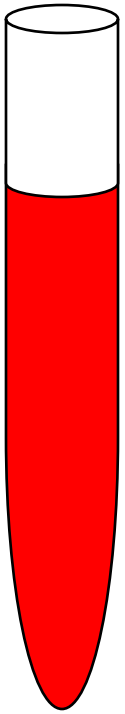
Гематологический миксер

- Для перемешивания крови и других проб в закрытых пробирках
- Осторожное и тщательное перемешивание проб является необходимым условием для анализа крови на гематологических анализаторах, особенно с дифференцировкой лейкоцитов
- Тщательное перемешивание благодаря постоянному встряхиванию при вращении

Diatron®

Структура клинико-лабораторного анализатора

Общеклинический анализ крови



20%

1. Подсчет клеток крови

Эритроциты
Лейкоциты
Тромбоциты

2. Дифференцировка лейкоцитов

Нейтрофилы
Эозинофилы
Лимфоциты
Моноциты
Базофилы

3. Определение концентрации гемоглобина

80%

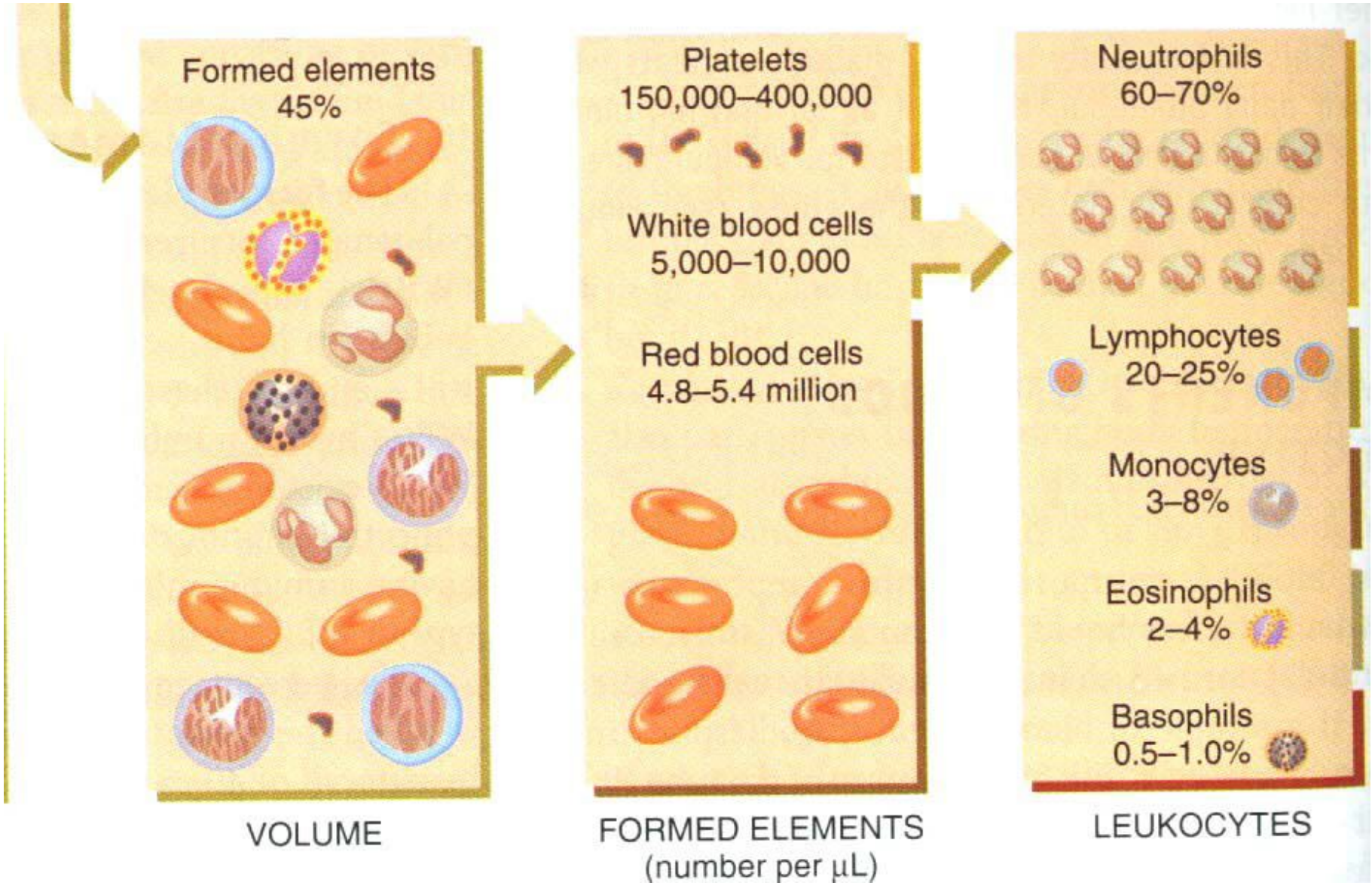
4. Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ)

Морфологические характеристики клеток крови

	Объемная концентрация (%)	Численная концентрация (клеток/мм^3)	Типичные размеры (мкм)
Эритроциты	46	$(4,2 – 4,8) \cdot 10^6$	7,1÷9,2
Лейкоциты	1,2	$(4 – 8) \cdot 10^3$	8 ÷22
Тромбоциты	0,3	$(2,5 – 5) \cdot 10^5$	2 ÷ 4

Лейкоцитарная формула

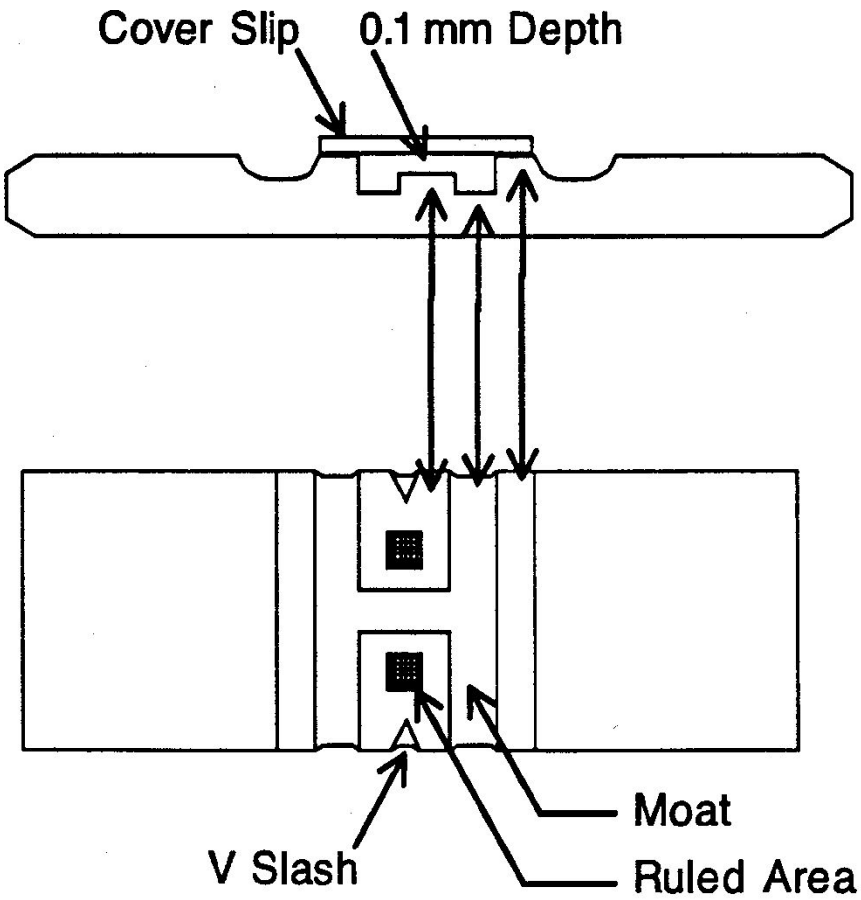
Лейкоциты, 10^9 /л	Эозинофилы, %	Базофилы, %	Нейтрофилы, %			Лимфоциты, %	Моноциты, %
			юные	палочкоядерные	Сегменто-ядерные		
4,0 - 9,0	1 - 4	0 - 0,5	0 - 1	2 - 5	55 - 68	25 - 30	6 - 8


Formed elements
45%
Platelets
150,000–400,000
White blood cells
5,000–10,000
Red blood cells
4.8–5.4 million
Neutrophils
60–70%
Lymphocytes
20–25%
Monocytes
3–8%
Eosinophils
2–4%
Basophils
0.5–1.0%
VOLUME
FORMED ELEMENTS
(number per μL)
LEUKOCYTES

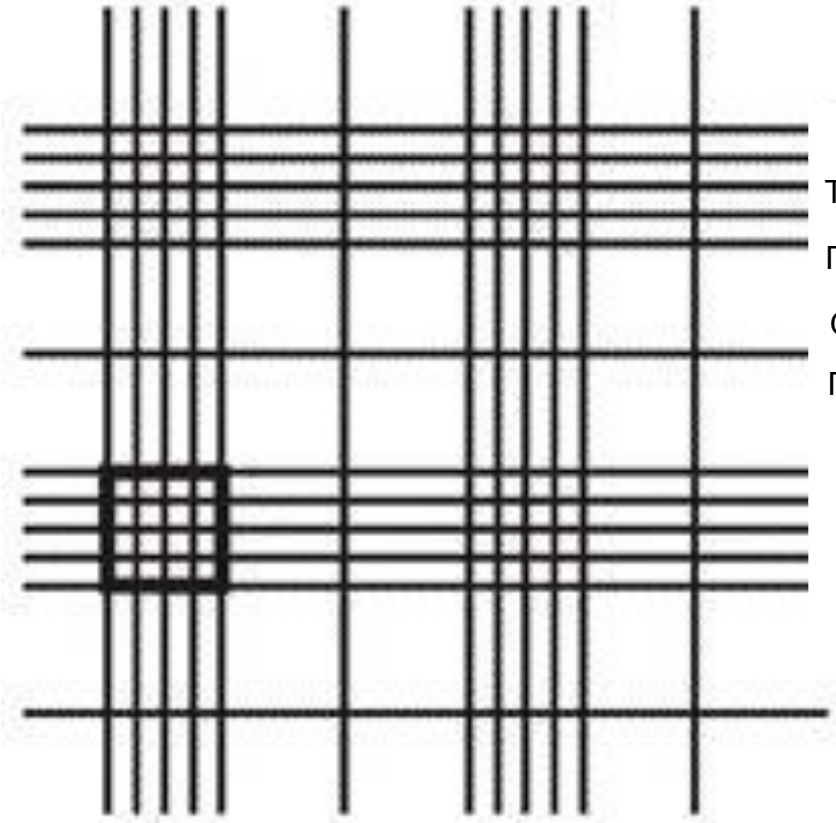
Известные способы проведения анализов крови можно условно разделить на **ручные** и **автоматизированные**.

Ручные способы основаны на изучении под микроскопом мазков крови.

В настоящее время при анализе крови используются специальные приборы - гематологические анализаторы (гемоцитометры).

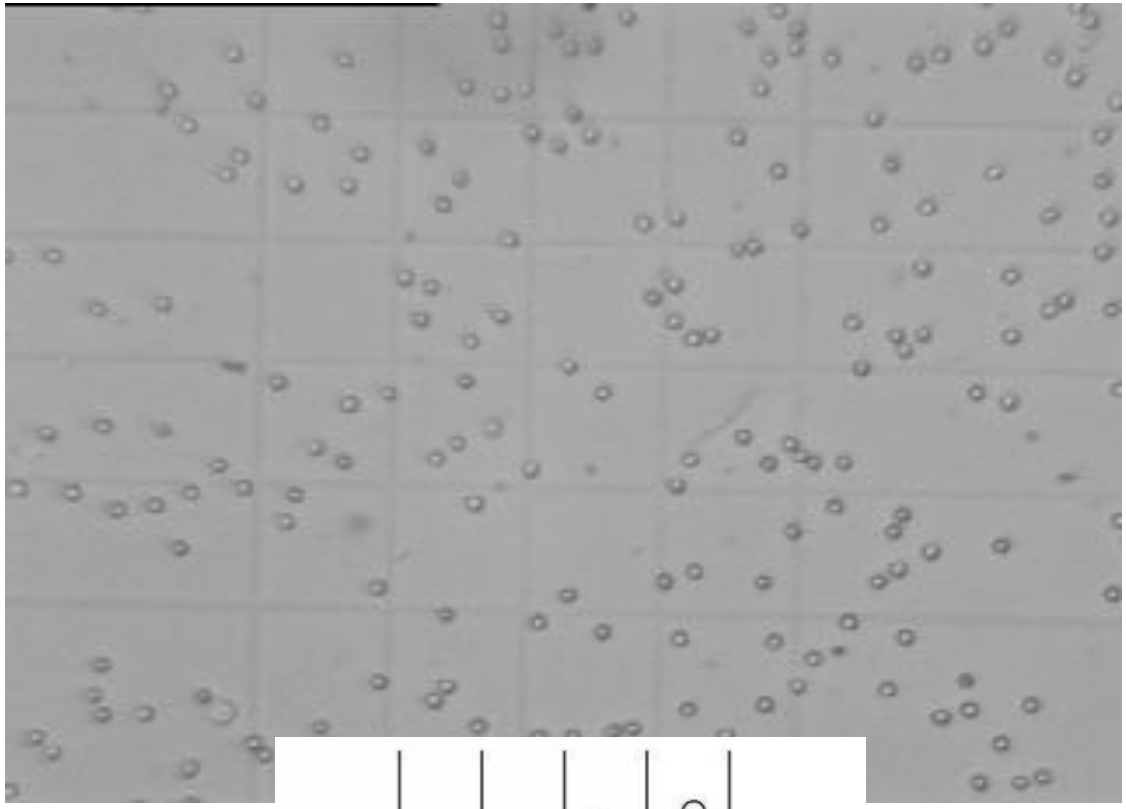


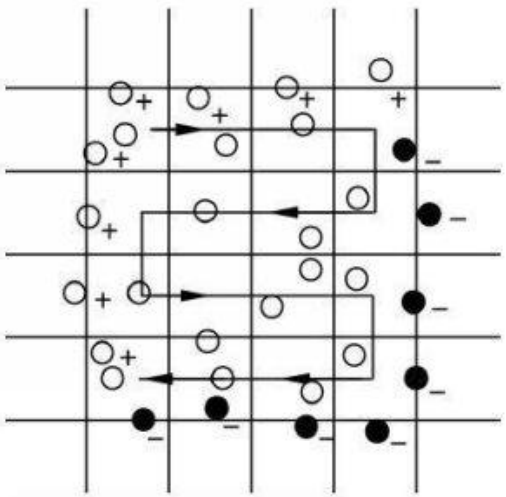
Камера для микроскопического исследования клеток крови



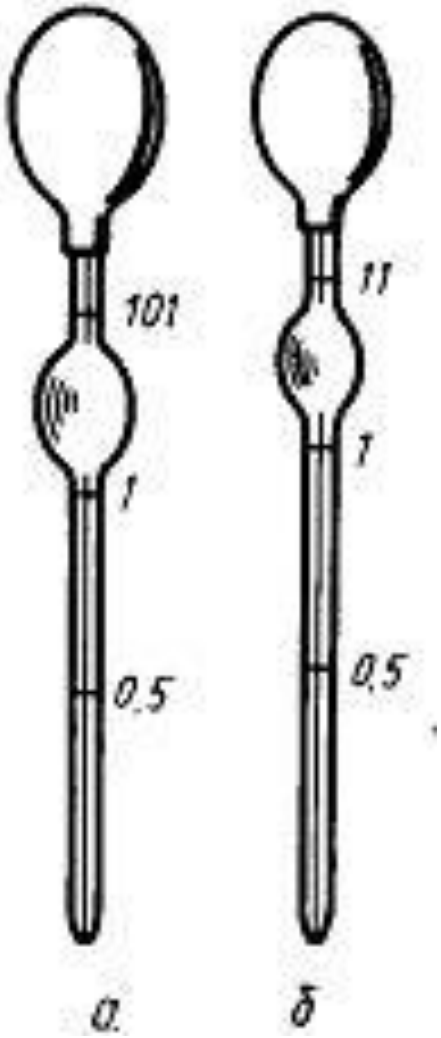
Количество сеток	2	4	4
Тип нанесения сетки		гравировка	
Глубина камеры, мм		0,1±0,004	
Объем камеры, мм^3	0,9		0,676
Площадь сетки, мм^2	9		6,76
Сторона большого квадрата, мм		0,2±0,002	
Сторона малого квадрата, мм		0,05±0,004	
Сторона сетки, мм	3±0,005		2,6±0,005

Сетка измерительной области камеры





Порядок подсчета эритроцитов



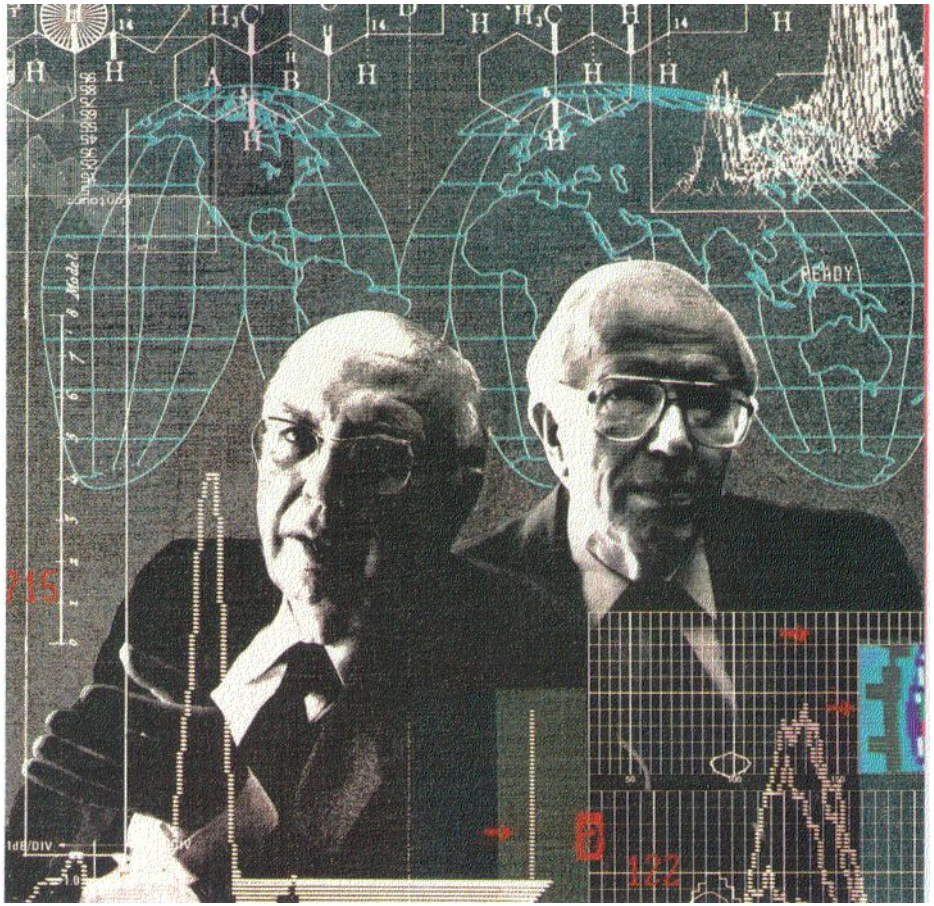
Основными источниками ошибок при подсчете эритроцитов в камере Горяева

- Неточное взятие крови в пипетку.
- Образование сгустка, поглощающего часть клеток и занижающего результат исследования.
- Недостаточное перемешивание содержимого пробирки перед заполнением камеры.
- Неправильная подготовка камеры: недостаточное притирание покровных стекол; неравномерное заполнение камеры, образование пузырьков воздуха и .т.д.
- Подсчет эритроцитов сразу после заполнения камеры, не выжидая 1 минуту.
- Подсчет меньшего, чем требуется по методике, количества квадратов.
- Плохо вымытые камера, пробирки, пипетка, капилляр для взятия крови; недостаточно просушенные пробирки и пипетки.
- Использование недоброкачественного разводящего раствора.

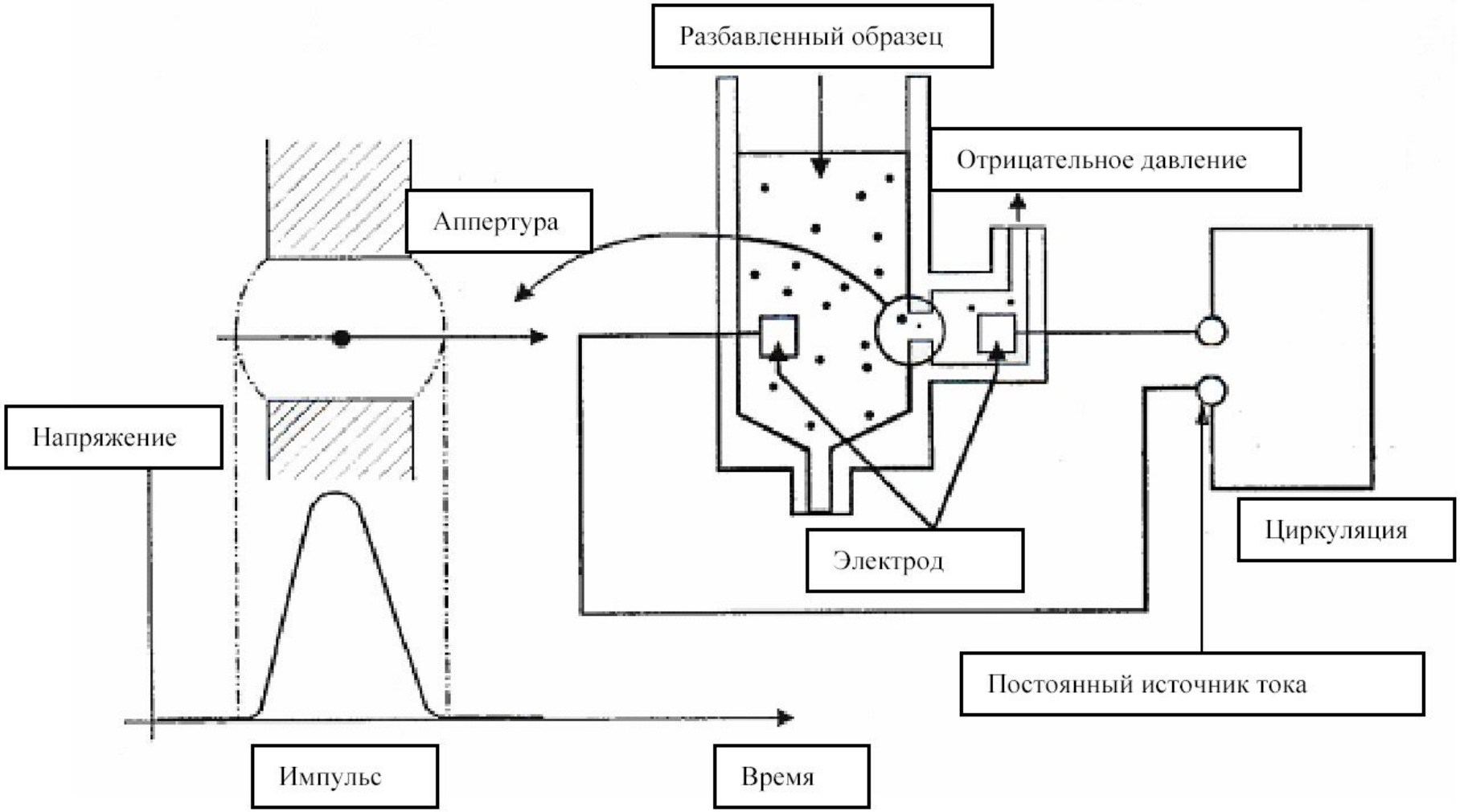
Основные источники ошибок при подсчете лейкоцитов в камере:

- Неправильное соотношение объемов крови и уксусной кислоты, взятые в пробирку.
- Неправильно подготовленный раствор уксусной кислоты (при концентрации большей, чем 5%, часть лейкоцитов может лизироваться, что приведет к занижению результата).
- Длительное нахождение пробы при температуре выше 28^0С, что может ускорить лизис лейкоцитов в образце и привести к занижению результата.
- Неправильное заполнение камеры Горяева (камеру необходимо оставлять на 1 минуту для оседания клеток).
- Недостаточно хорошо отмытая после предыдущего определения камера Горяева. Оставшиеся в камере лейкоциты могут завышать результаты анализа.

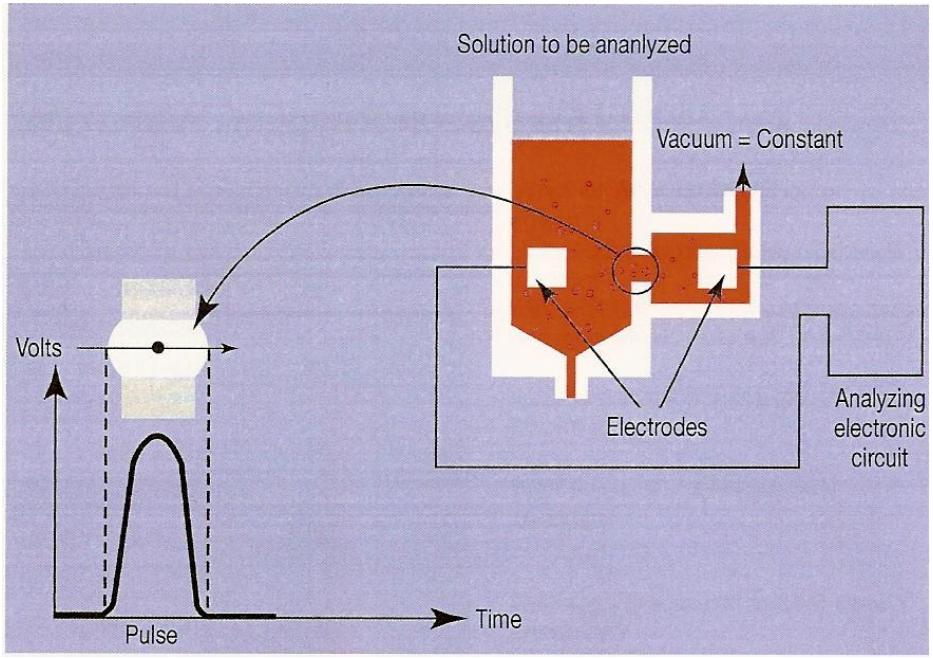
«Мы сделаем анализ крови легче, быстрее, надежнее.
Больной будет в максимальной выгоде.
Coulter W.H.
Coulter Jr.»

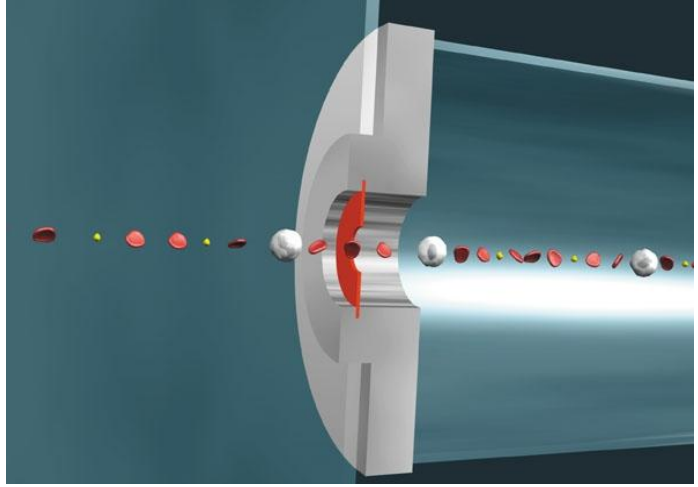


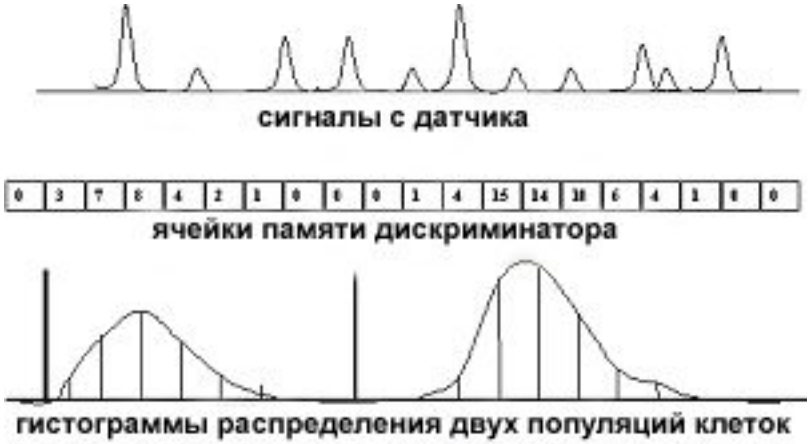
Принцип кондуктометрического метода (м-д Культера)



Принцип кондуктометрического метода (м-д Культера)







Условия получения достоверного результата

- В канале датчика всегда должно быть не больше одной клетки.
- В пробе не должно быть частиц аналогичных по своим электрическим характеристикам анализируемым клеткам крови

Абсолютный объем частиц V может быть определен из следующего выражения:

$$V = A^2 \cdot f_k \cdot \Delta E / r \cdot i \cdot F,$$

Где

A – площадь поперечного сечения отверстия,

f_k – поправочный коэффициент для учета геометрии отверстия и пути прохождения частицы через него,

r - удельное сопротивление жидкой среды,

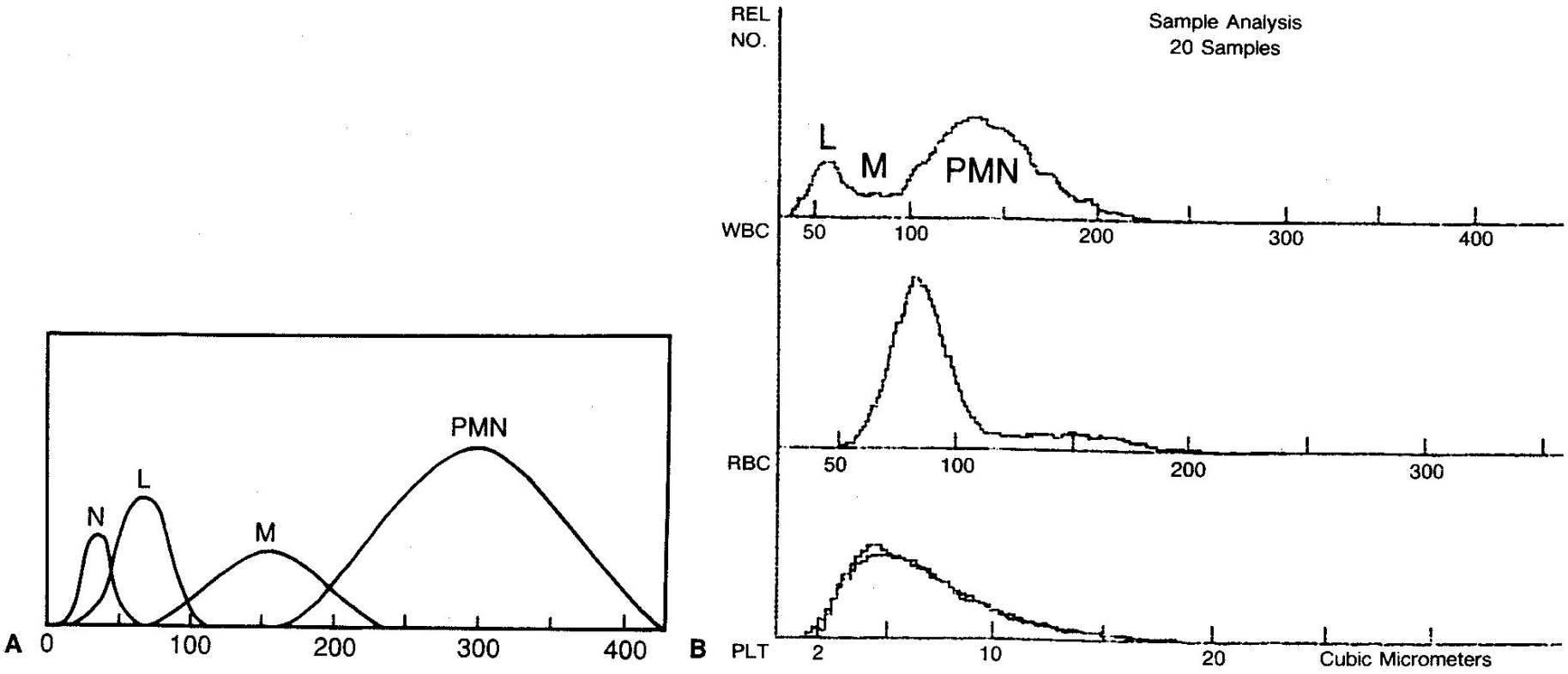
i – ток через отверстие (неизменный),

F – коэффициент, учитывающий форму и проводимость частицы,

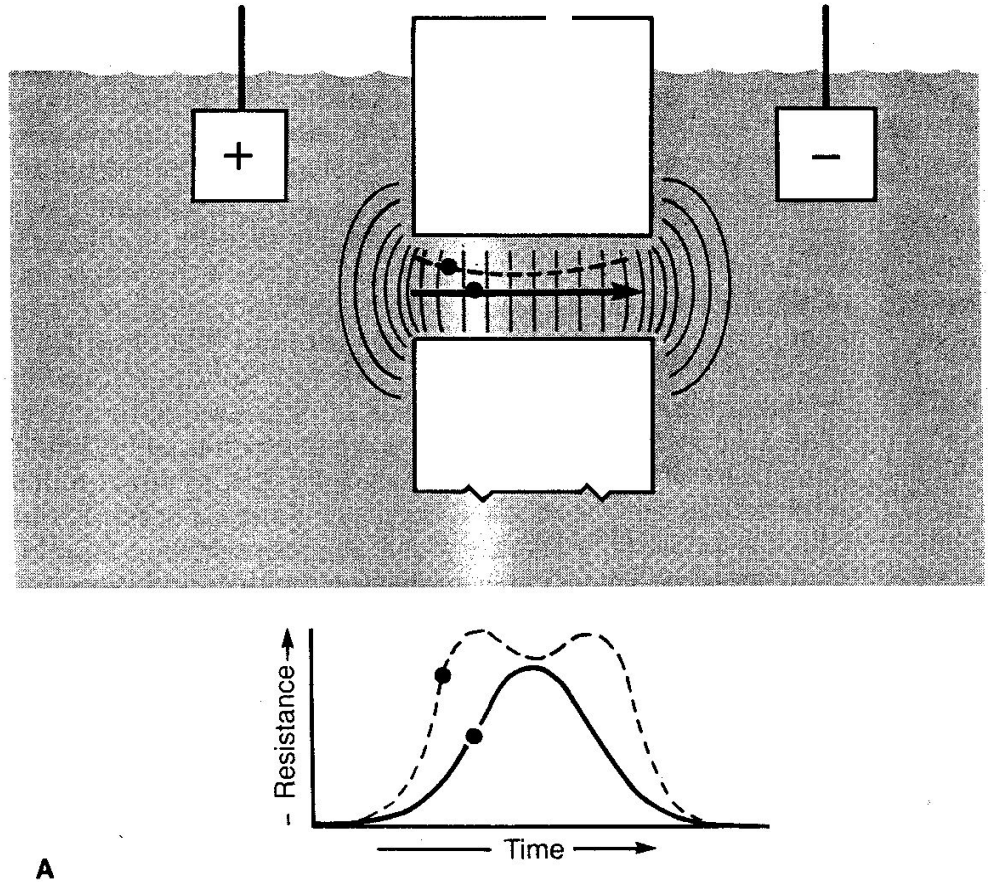
Δ E – амплитуда вырабатываемого импульса напряжения.

Cell type	Size (fL)
Lymphocytes	35 – 90
Monocytes	90 – 160
Granulocytes	160 – 450

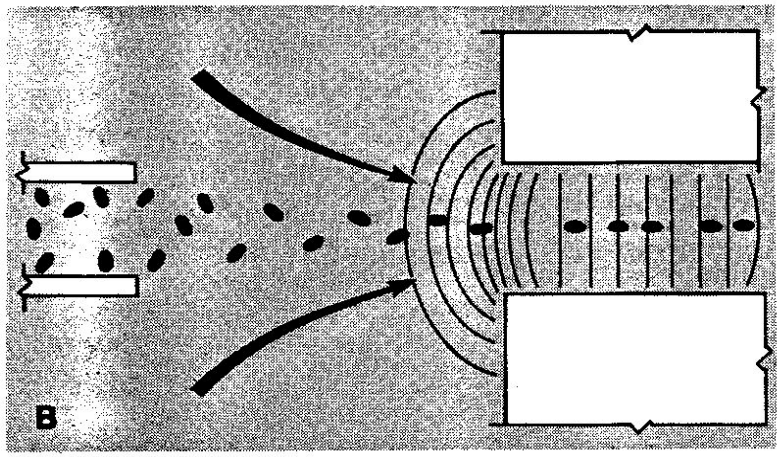
Размер белых клеток крови

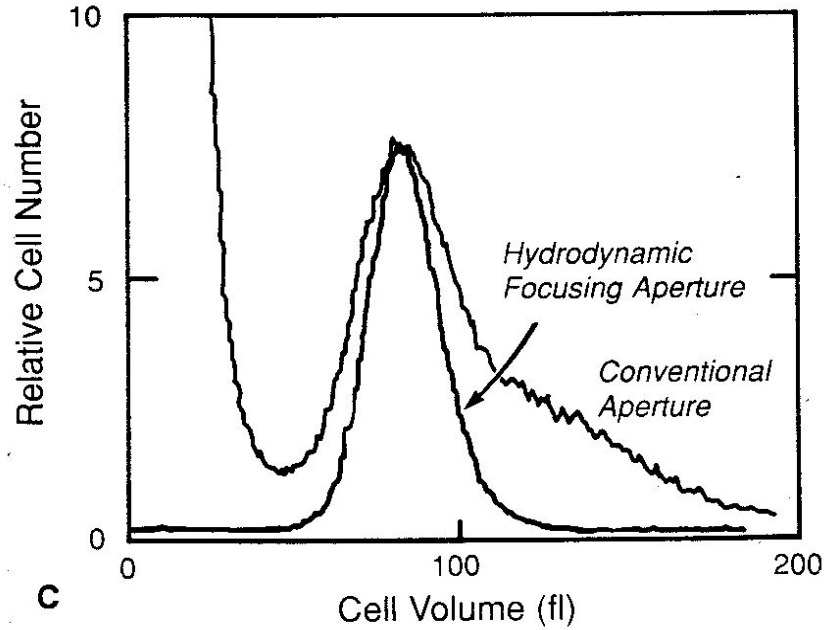


Number of cells versus cell volume from a Coulter counter. (a) Nucleated RBCs (N), lymphocytes (L), mononuclear cells (M), and polymorphonuclear leukocytes (PMN). (b) Leukocyte differential distribution (WBC), RBC distribution (RBC), and platelet distribution (PLT).



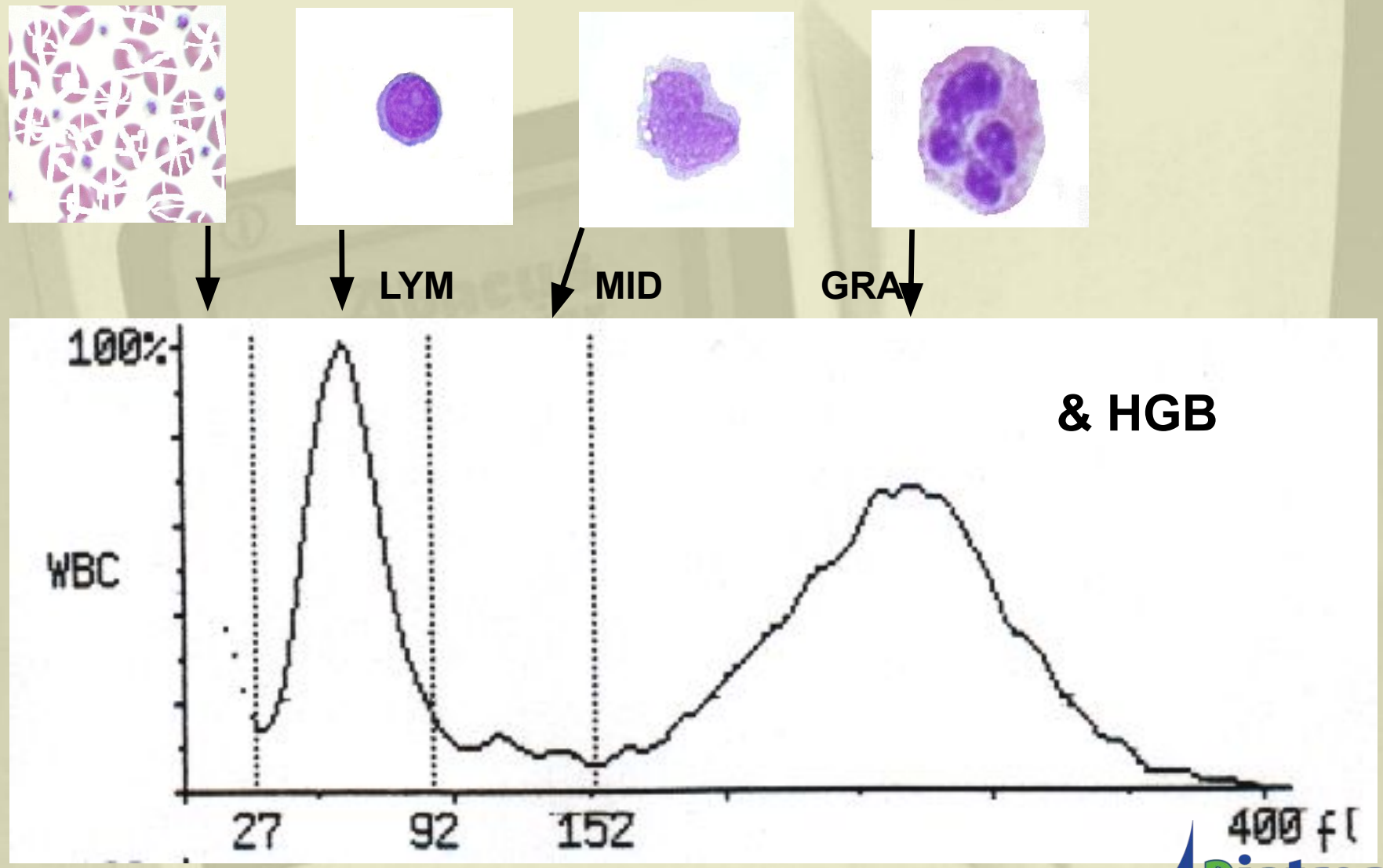
Метод Култера (Coulter)





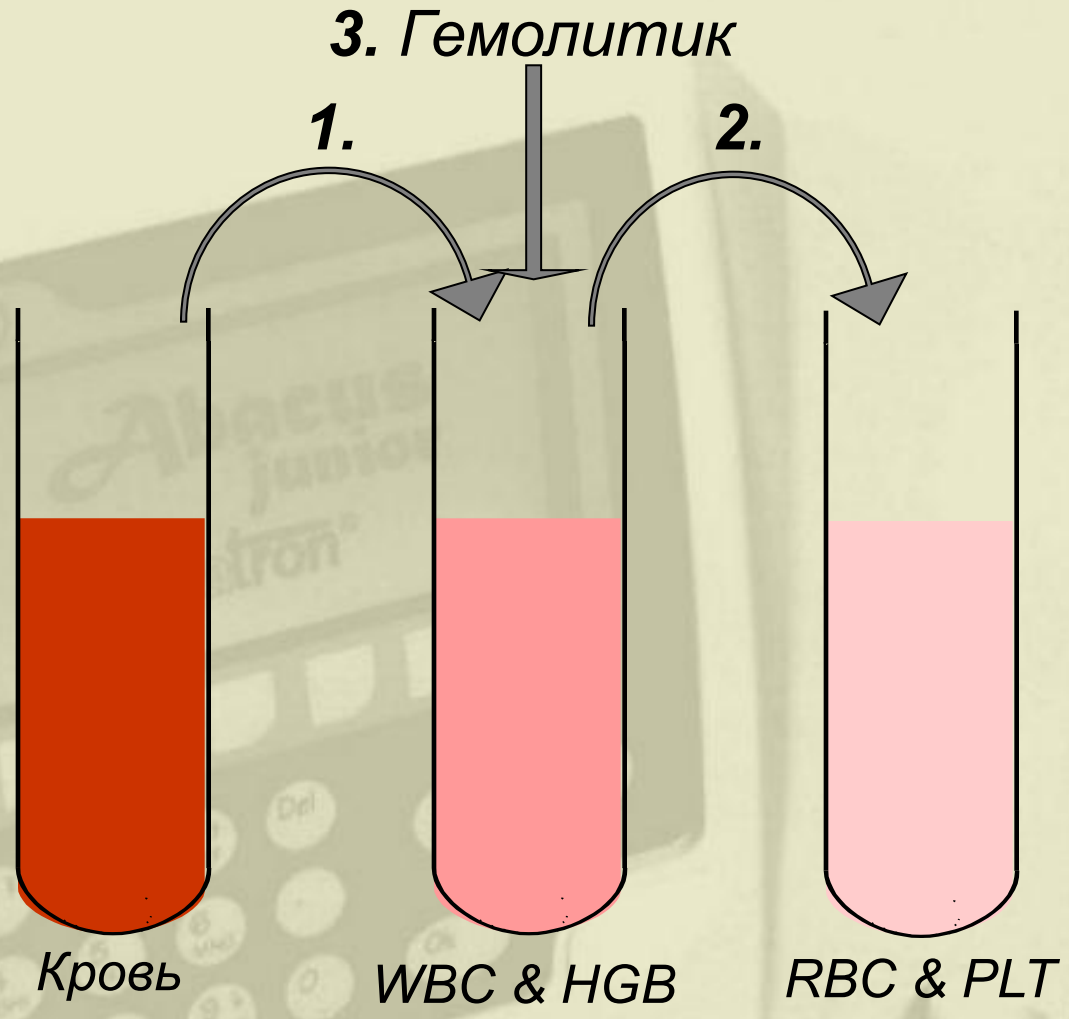
Гидродинамическая фокусировка клеток

Процесс дифференциального лизиса

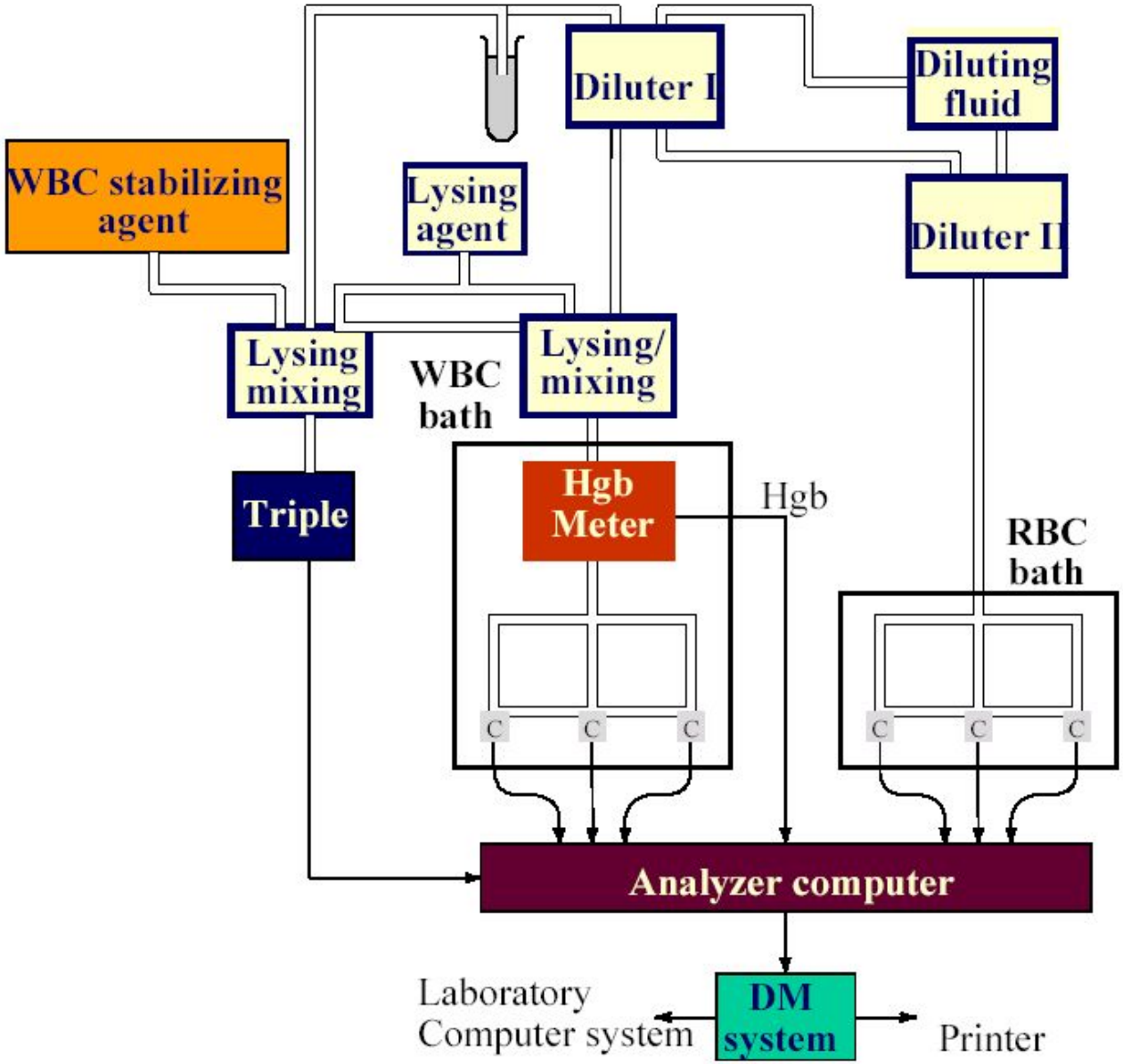


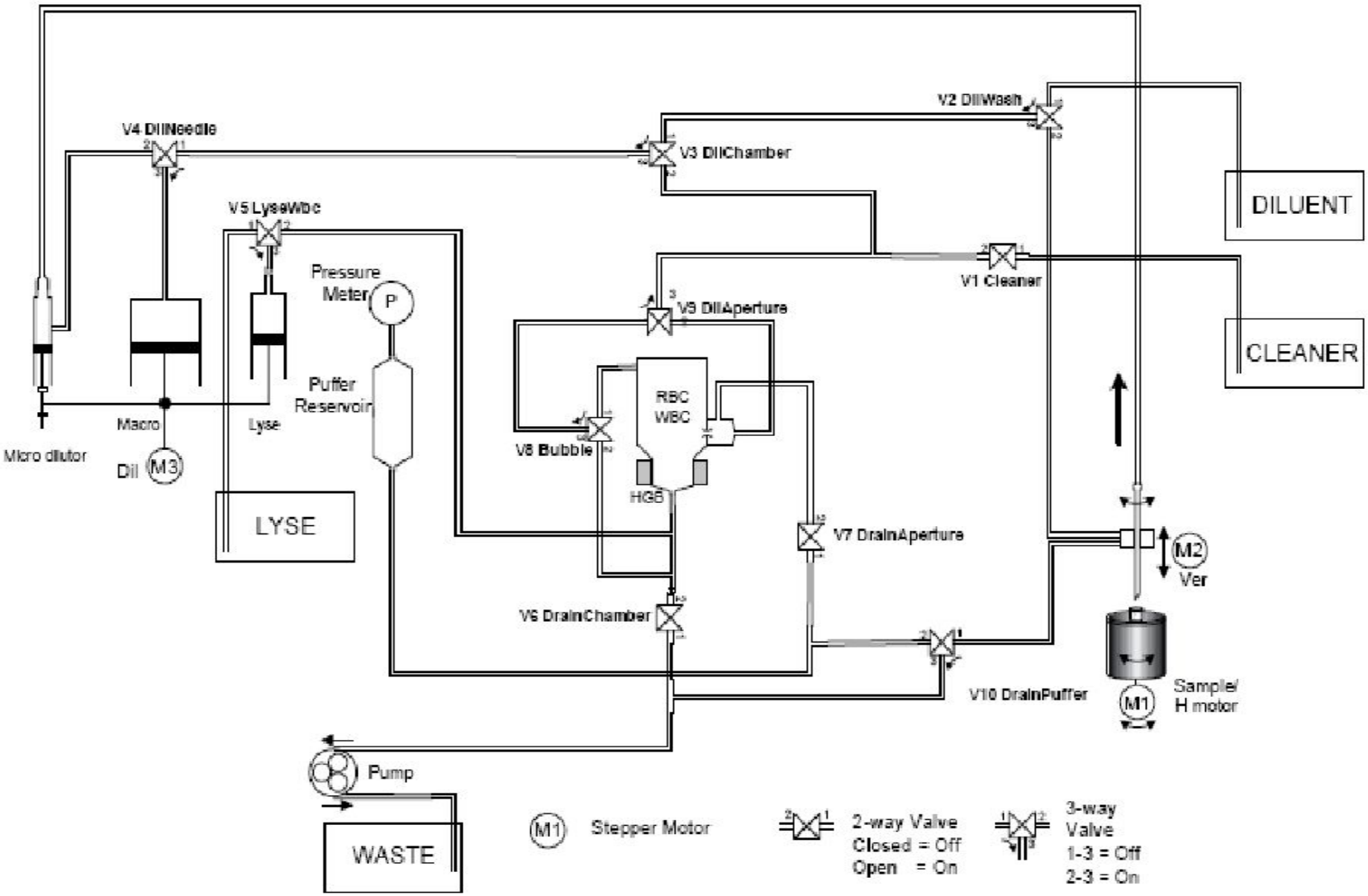
Diatron

Разведение: дилюент, гемолитик

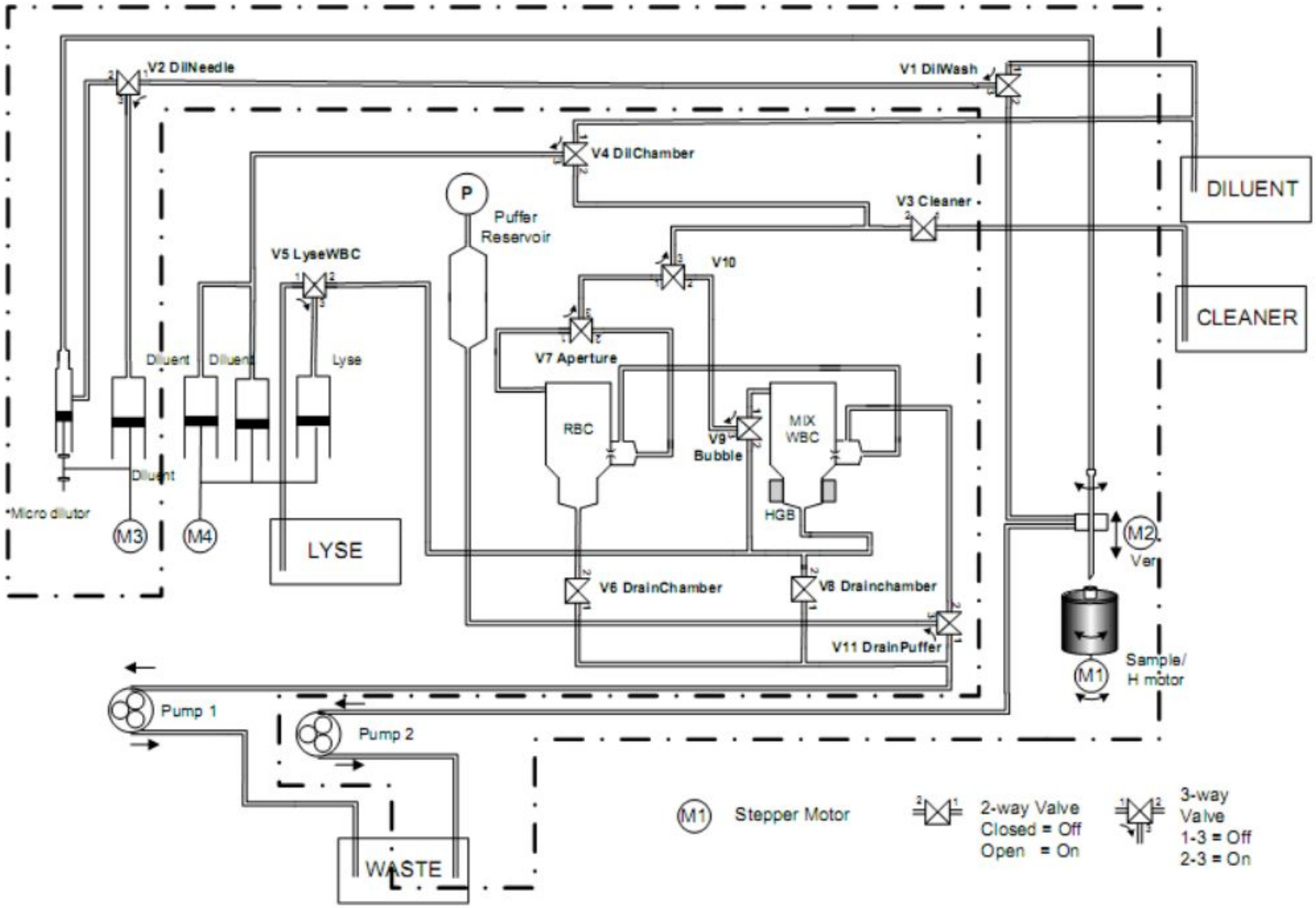


Анализаторы подготавливают два разведения проб крови.

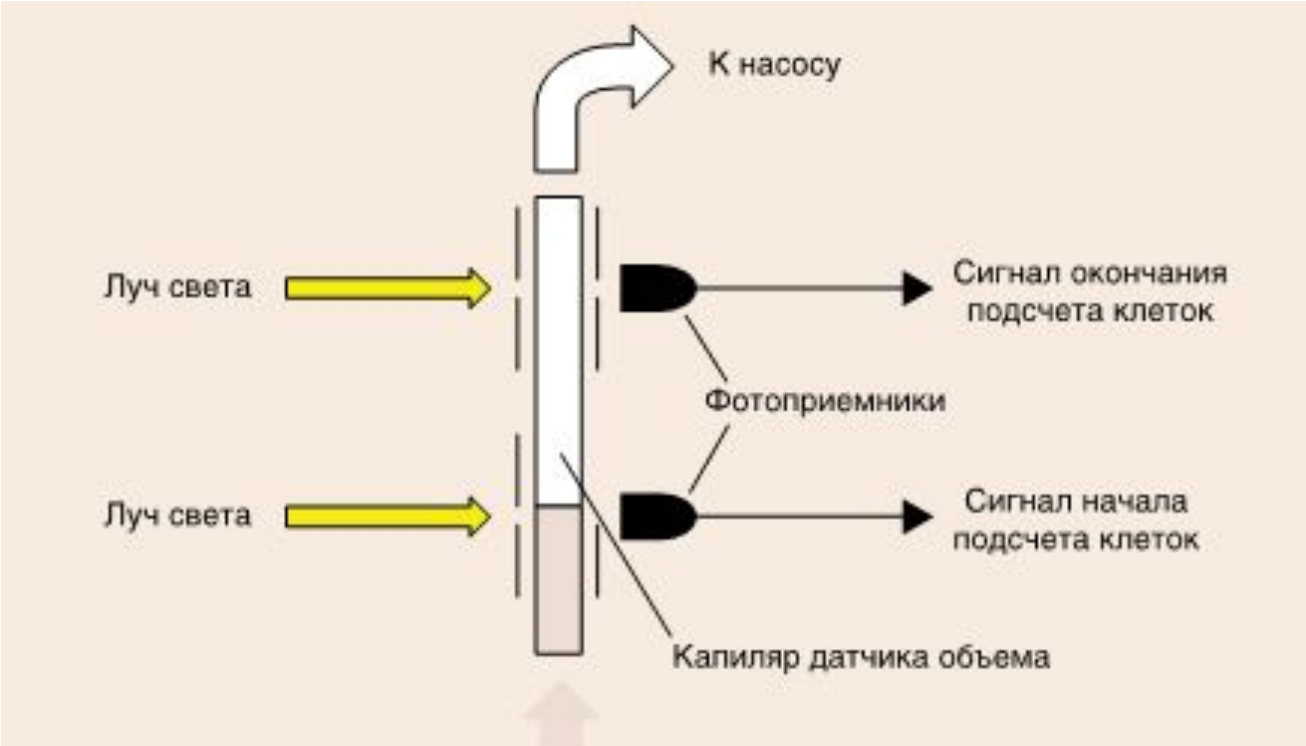

Diluter I
Diluting fluid
WBC stabilizing agent
Lysing agent
Diluter II
Lysing mixing
WBC bath
Lysing/ mixing
Triple
Hgb Meter
Hgb
RBC bath
C
C
C
C
C
C
Analyzer computer
Laboratory Computer system
DM system
Printer


V4 DilNeedle
V5 LyseWbc
V3 DilChamber
V2 DilWash
DILUENT
V1 Cleaner
CLEANER
Pressure Meter
P
V9 DilAperture
Puffer Reservoir
RBC
WBC
HGB
V8 Bubble
Macro
Lyse
Micro dilutor
Dil
M3
LYSE
V7 DrainAperture
M2
Ver
V6 DrainChamber
V10 DrainPuffer
M1
Sample/
H motor
Pump
WASTE
M1
Stepper Motor
2-way Valve
Closed = Off
Open = On
3-way
Valve
1-3 = Off
2-3 = On

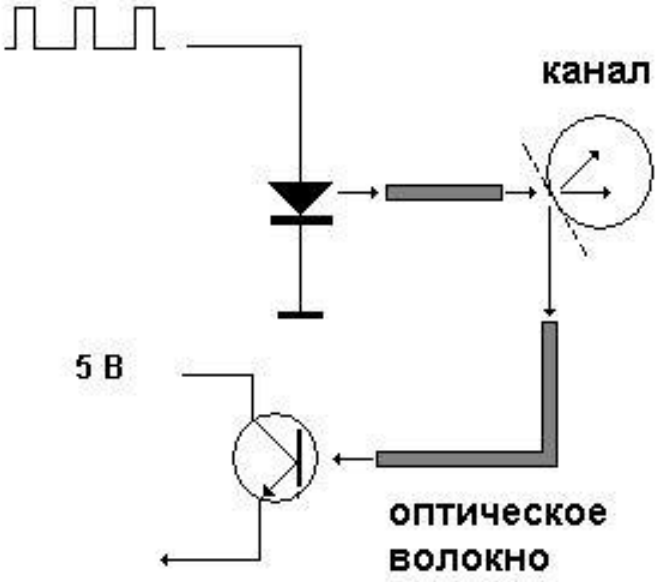
Abacus 380


V2 DilNeedle
V1 DilWash
V4 DilChamber
V3 Cleaner
DILUENT
CLEANER
P
Puffer
Reservoir
V5 LyseWBC
V10
V7 Aperture
Diluent
Diluent
Lyse
Diluent
Micro dilutor
M3
M4
LYSE
RBC
V9
Bubble
MIX
WBC
HGB
M2
Ver
V6 DrainChamber
V8 Drainchamber
V11 DrainPuffer
Sample/
H motor
M1
Pump 1
Pump 2
WASTE
M1
Stepper Motor
2-way Valve
Closed = Off
Open = On
3-way
Valve
1-3 = Off
2-3 = On

Волюметрическое измерение

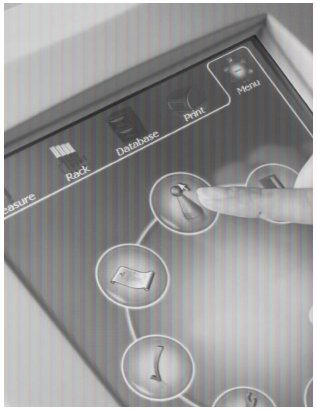


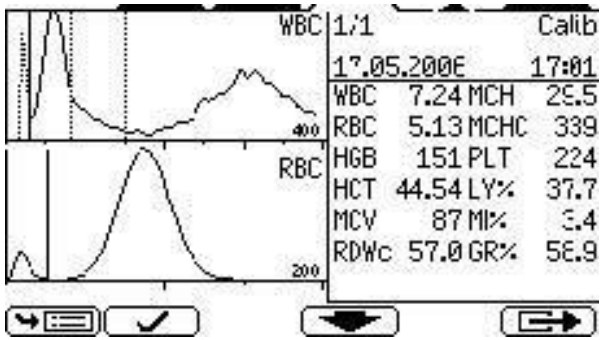
. Оптический датчик заполнения трубок



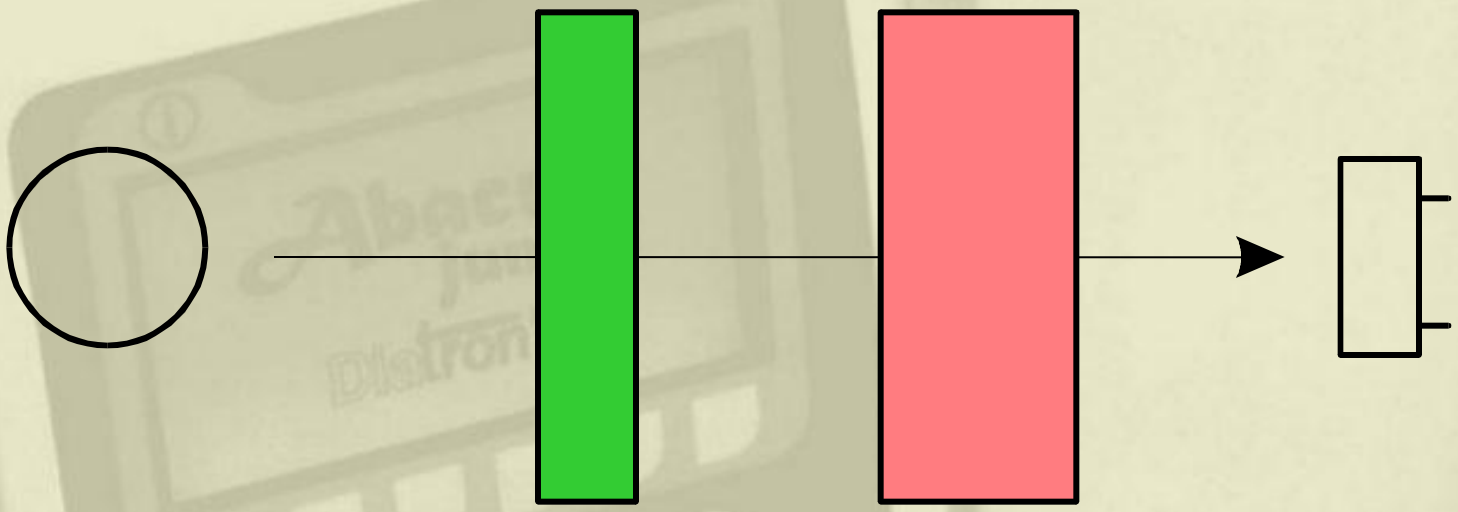
Порядок работы

1. Забор крови и смешивание крови с соответствующим антикоагулянтом (ЭДТА).
2. Включение анализатора (выполнение автоматических процедур перед началом работы: проверка, заполнение реагентами, измерение бланка).
3. Установка пробирки с кровью в анализатор.
4. Запуск измерения (кнопка START).
5. Автоматический анализ пробы и выдача результатов на дисплей или принтер.





Измерение гемоглобина



Источник света (лампа)

540 нм фильтр

Разведенная проба с гемолитиком

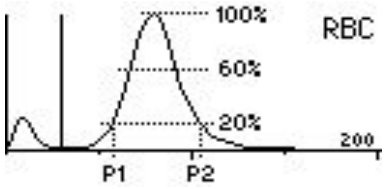
Фото-детектор

Определяемые параметры

Эритроциты – RBC (клеток/л, клеток/мкл)	Количество эритроцитов. RBC = RBCcal x (клеток/л или клеток/мкл)
Лейкоциты – WBC (клеток/л, клеток/мкл)	Количество лейкоцитов. WBC = WBCcal x (клеток/л или клеток/мкл)
Концентрация гемоглобина – HGB (г/дл, г/л, ммоль/л)	Фотометрическое измерение при 540 нм; в каждом цикле выполняется измерение бланка по реагенту. HGB = HGBcal x (HGBпробы – HGBblank)
Средний объем эритроцитов – MCV (фл)	Средний объем эритроцитов определяется по RBC-гистограмме.
Среднее содержание гемоглобина в эритроците – MCH (пг, фмоль)	Среднее содержание гемоглобина в эритроците рассчитывается по значениям RBC и HGB. MCH = HGB / RBC
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах – MCHC (г/дл, г/л, ммоль/л)	Рассчитывается по значениям HGB и HCT. MCHC = HGB / HCT (абсолют.) Единицы измерения отражаются в соответствии с выбором единиц для результатов HGB (г/дл, г/л или ммоль/л)

Diatron®

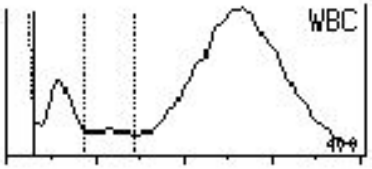
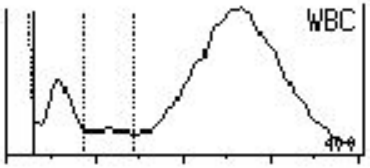
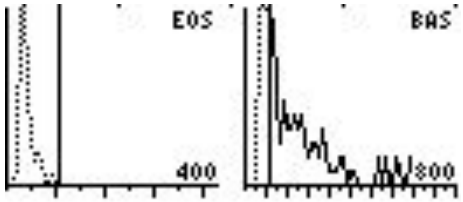
Определяемые параметры

Широта распределения эритроцитов – RDW-SD (фл) и Широта распределения эритроцитов – **RDW-CV** (%)	Широта распределения популяции эритроцитов и тромбоцитов определяется по гистограмме по 20% пикам xDW-SD = RDW cal x (P2 - P1) (fl), xDW-CV = RDW cal x 0.56 x (P2 - P1) / (P2 + P1) CV корригируется по фактору 0,56 к 60% выборке 

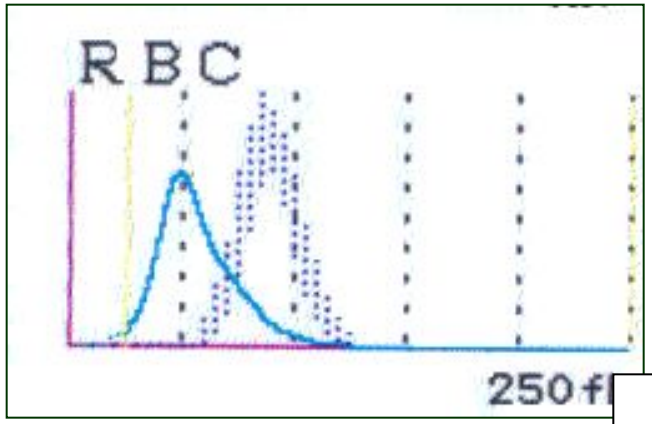
Гематокрит – HCT (%, абсолютное значение)	Рассчитывается по значениям RBC и MCV. HCT (%) = RBC x MCV x 100, HCT (абсолют.) = RBC x MCV

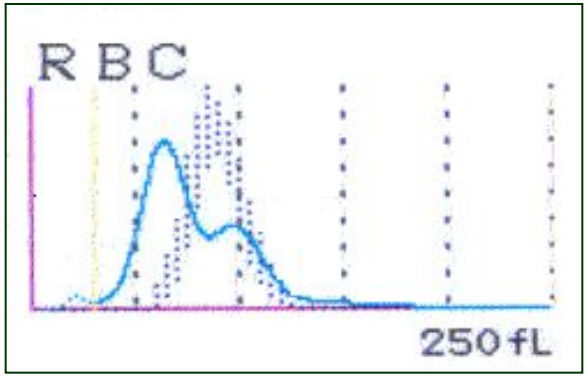
Тромбоциты – PLT (клеток/л, клеток/мкл)	Количество тромбоцитов PLT = PLT cal x (клеток/л, клеток/мкл)
Средний объем тромбоцитов – MPV (фл)	Определяется по PLT-гистограмме.
Тромбокрит – PCT (%, абсолютное значение)	Рассчитывается по значениям PLT и MPV. PCT (%) = PLT x MPV x 100, PCT (абсолют.) = PLT x MPV

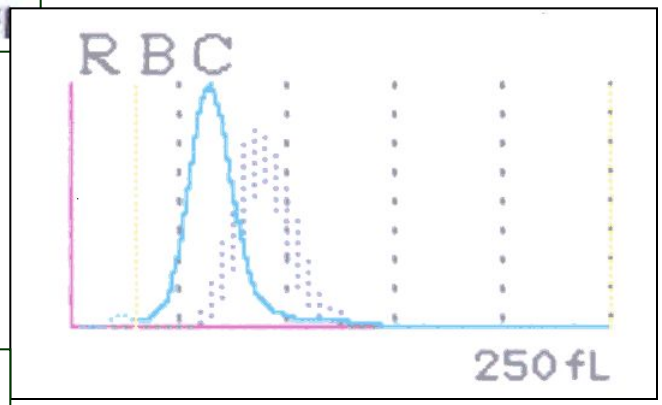
Определяемые параметры

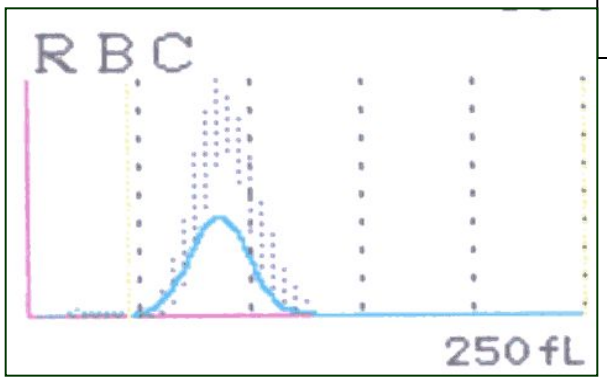
Лейкоциты – WBC (клеток/л, клеток/мкл)	Количество лейкоцитов. WBC = WBCcal x (клеток/л или клеток/мкл)
Дифференцировка лейкоцитов на 3 части: 1. **LYM**, **LY%**: лимфоциты 2. **MID**, **MID%**: моноциты и некоторые эозинофилы 3. **GRA**, **GR%**: нейтрофилы, эозинофилы и базофилы	Абсолютные значения подсчитываются по каналам, заданным по трем дискриминаторам лейкоцитов (WBC): Проценты рассчитываются по абсолютным значениям WBC.  1.: RBC-LYM discriminator 2.: LYM-MID discriminator 3.: MID-GRA discriminator
Дифференцировка лейкоцитов на 5 частей: 1. **LYM**, **LYM%**: лимфоциты 2. **MON**, **MON%**: моноциты и некоторые эозинофилы 3. **NEU, NEU%** нейтрофилы	Абсолютные значения подсчитываются по каналам, заданным по трем дискриминаторам лейкоцитов (WBC): Проценты рассчитываются по абсолютным значениям WBC.  1.: RBC-LYM discriminator 2.: LYM-MID discriminator 3.: MID-GRA discriminator
4. **BAS, BAS%** базофилы 5. **EOS, EOS%** эозинофилы	Каждая кривая распределения представляет данную популяцию лейкоцитов. 

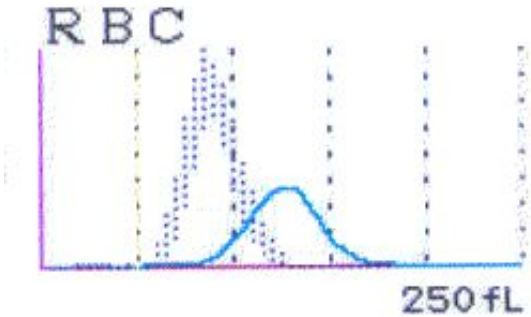
RBC-гистограмма



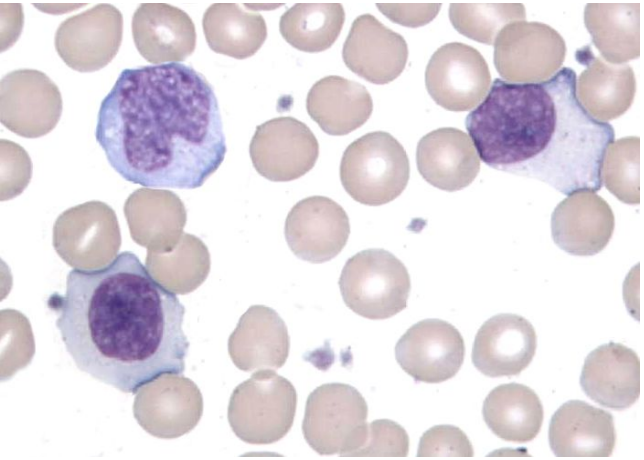


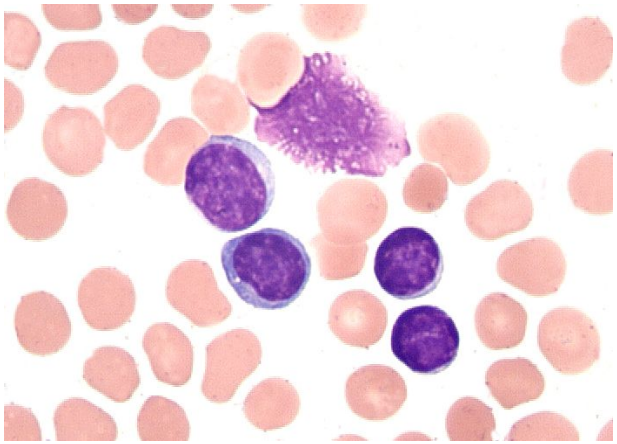


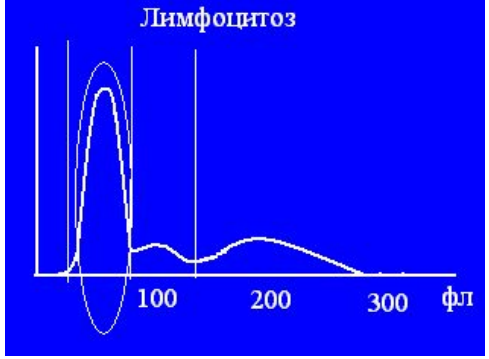


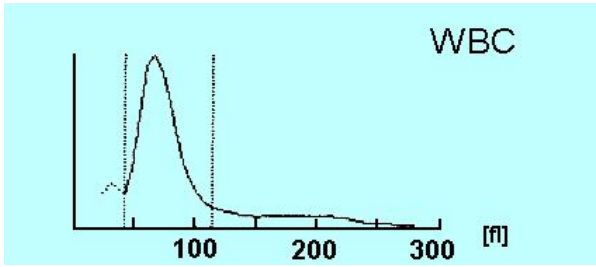


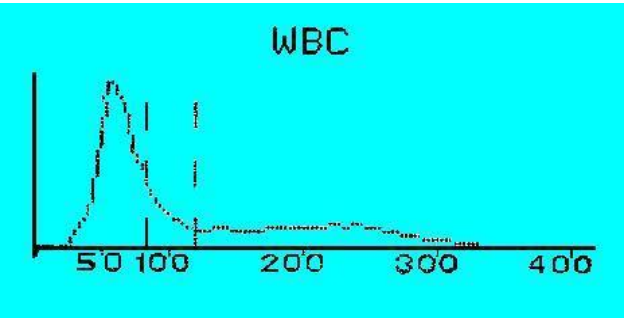
Изменения WBC-гистограмм. Лимфоцитоз

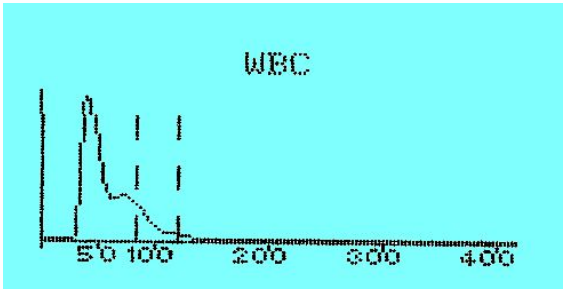


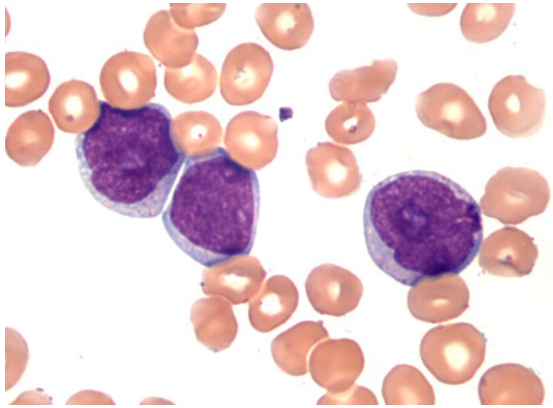










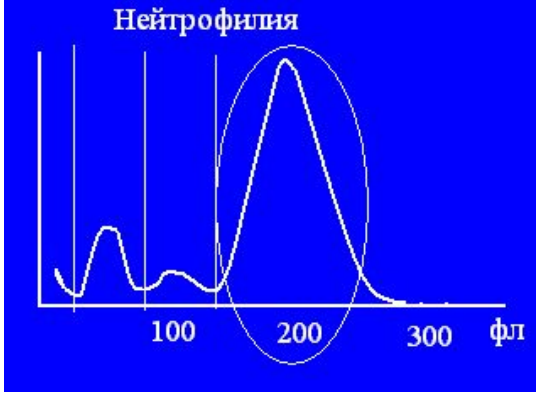


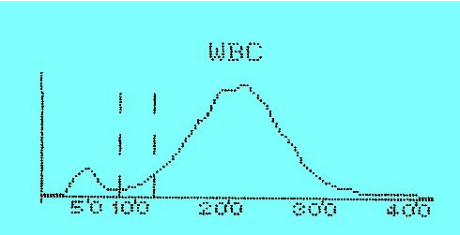
WBC – 7,9x10^9/л, палочкоядерные нейтрофилы – 14%, сегментоядерные нейтрофилы – 13%, моноциты – 7%, лимфоциты – 66%(из них 30 – атипичные мононуклеары)

WBC – 229.0x10^9/л, сегментоядерные нейтрофилы – 2%, лимфоциты – 98%.

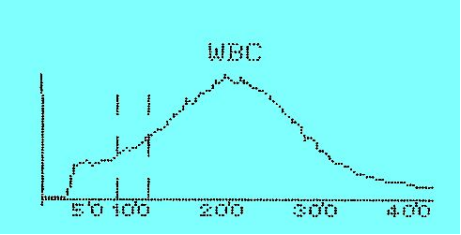
WBC – 35,0x10^9/л, бласты - 66%, миелоциты – 7%, палочкоядерные нейтрофилы – 4%, сегментоядерные нейтрофилы – 13%, моноциты – 2%, лимфоциты – 8%.

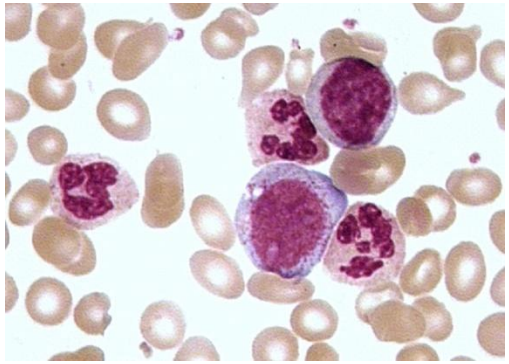
Изменения WBC-гисограмм. Нейтрофилез



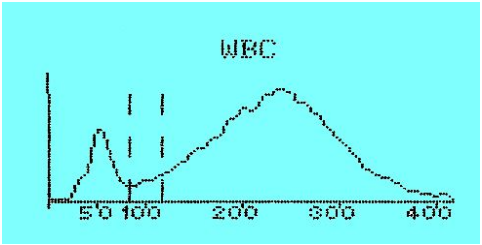


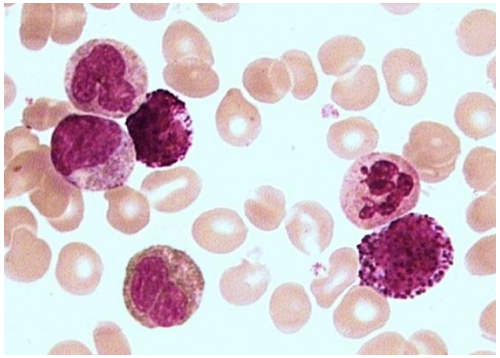
Лейкоцитарная гистограмма периферической крови больного с лейкоцитозом (13,1 x10^9/л) и палочкоядерным сдвигом (11%).





WBC – 34,5x10^9/л, бласты – 7%, миелоциты – 18%, метамиелоциты – 2%, палочкоядерные нейтрофилы – 16%, сегментоядерные нейтрофилы – 39%, базофилы – 6%, моноциты – 6%, лимфоциты – 6%.

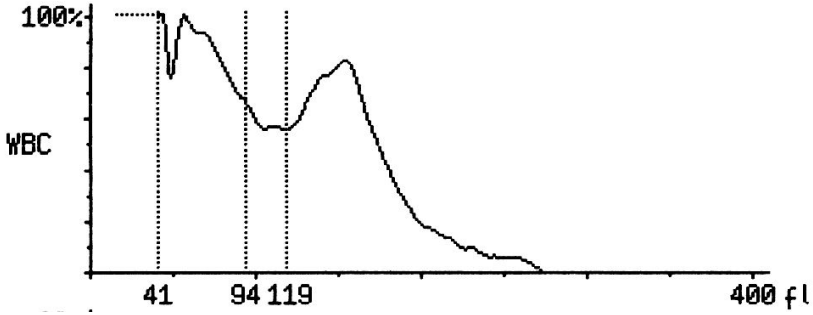




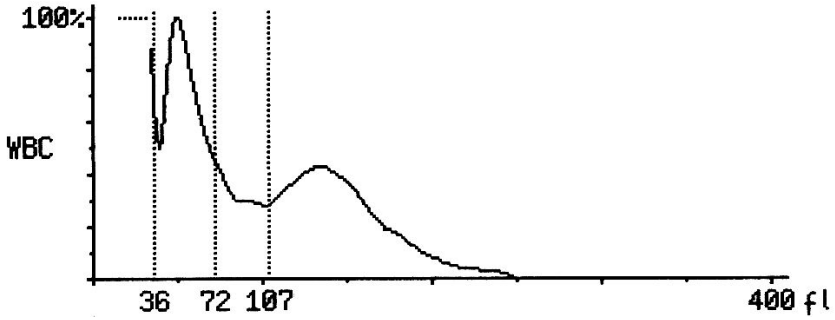
WBC – 117,2x10^9/л, бласты – 8%, миелоциты – 22%, метамиелоциты – 4%, палочкоядерные нейтрофилы – 15%, сегментоядерные нейтрофилы – 16%, эозинофилы – 15%, базофилы –14%, моноциты – 3%, лимфоциты – 3%.

Влияние количества гемолитика при дифференцировке WBC на 3 части

Пример «недолизированной»

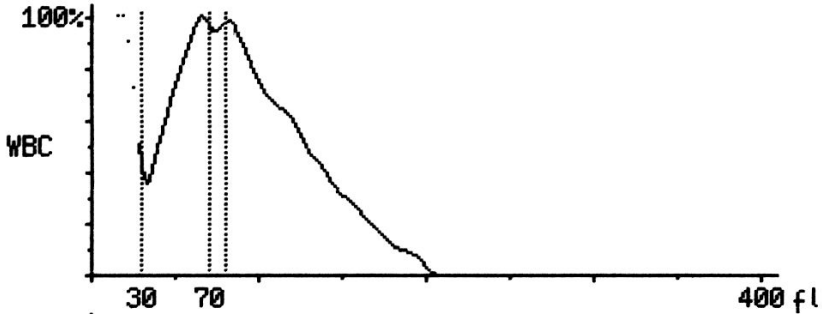


В недостаточно лизированных пробах некоторое количество эритроцитов RBC подсчитывается как лейкоциты WBC
WBC=16.9 больше референсного, LYM% высокий

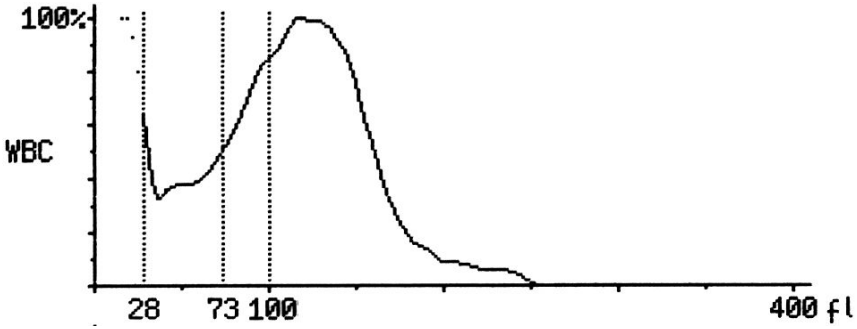


Та же проба с увеличением гемолитика (+0.1 мл)
WBC =13.7, корректный результат,
хорошая дифференцировка на 3 части

Пример «перелизированной»



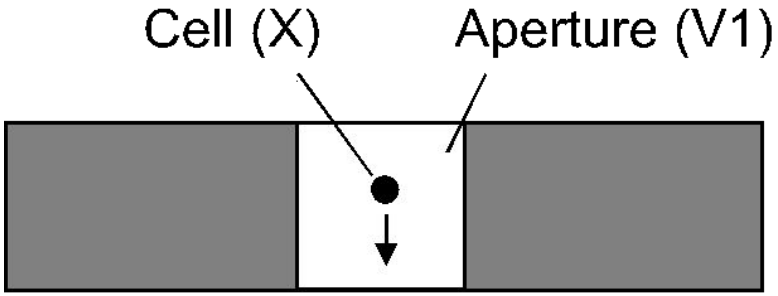
В чрезмерно лизированных пробах LYM и GRA перекрывают друг друга
WBC = 20.6 корректный результат,
плохая дифференцировка на 3 части



Та же проба с уменьшением гемолитика (-0.1 мл)
WBC = 21.0 корректный результат,
хорошая дифференцировка на 3 части

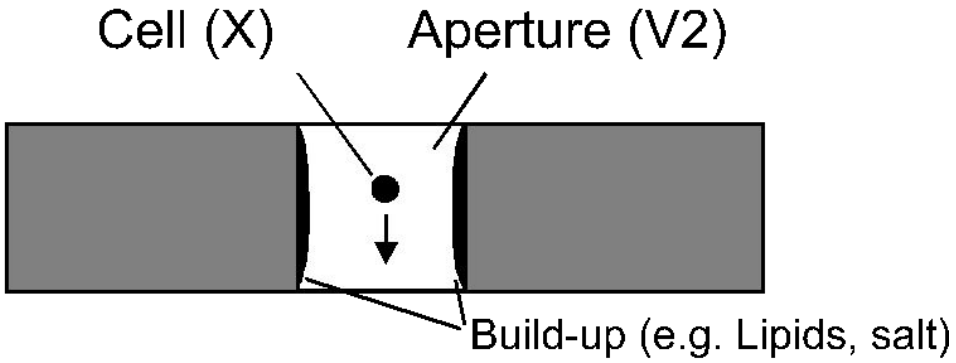
Эффект засора апертуры

Clean aperture



$$MCV1 \sim \frac{X}{V1}$$

Partially clogged aperture



$$MCV2 \sim \frac{X}{V2}$$

$$V2 < V1 \longrightarrow MCV2 > MCV1$$

Аксессуары и принадлежности

Наименование	Описание
Реагенты	• Изотонический разбавитель (дилюент) • Лизирующий раствор • Очищающий раствор • Специальные реагенты для эозинофилов и базофилов (Abacus junior 5, Abacus 5)
Принадлежности для забора крови	• Пробирки с (ЭДТА) • Салфетки
Принтер	Встроенный принтер, или внешний принтер: • лазерный, • струйный, • матричный, • термопринтер
Клавиатура	Стандартная клавиатура для PC
Устройства для перемешивания проб	Гематологический миксер

К основным достоинствам кондуктометрических счетчиков частиц относятся:

- высокая скорость счета и измерения частиц;
- хорошая воспроизводимость результатов;
- способность определять малые концентрации частиц;
- малый объем пробы, необходимый для анализа;
- возможность регистрировать кривые распределения по размерам;
- простота конструкции и обслуживания по сравнению с приборами других типов.

Недостатки кондуктометрических счетчиков:

- Анализируемые частицы обязательно должны находиться в жидком электролите, проводимость которого известна.
- Проводимость же биологических жидкостей, величина неопределенная и переменная, зависящая от многих факторов.
- При подсчете микрочастиц кондуктометрическим методом существуют очень жесткие ограничения на диаметр анализирующего отверстия, который должен быть порядка размеров микрочастиц.

3-diff гематологические анализаторы (или 18-параметровые) – **принцип Культера**.

- «видит» только объем клетки
- «не видит» внутреннюю структуру клетки, её морфологию
- клетки, имеющие один объем, но разную внутреннюю структуру выглядят совершенно одинаково
- ограничение метода непреодолимо технологически!

Обязательные процедуры обслуживания прибора

- Ежедневно: промывка E-Z раствором для белковой очистки.
- Еженедельно: очистка пробоотборника с помощью раствора Probe Cleaner
- Ежеквартально: осмотр состояния блока шприцов, очистка крышек измерительных камер.
- Очистка по требованию прибора с помощью раствора Probe Cleaner:
- Текущие процедуры:
  - Замена реагентов
  - Осушка трубок при коротко-временном выключении прибора
  - Консервация прибора при длительном выключении более 5 дней
- По требованию:
  - Раз в 3-6 месяцев в зависимости от нагрузки на прибор - замена блока обтирки иглы
  - Замена фильтров вакуума или давления
  - Замена наконечника поршня шприца разбавителя (1 раз в год или реже в зависимости от загрузки)

Весь ряд гематологических анализаторов по виду выполняемых исследований можно разделить на четыре типа

- **К первому типу** относятся приборы, выполняющие анализ по небольшому числу показателей, обычно по 6–8, и без дифференцирования лейкоцитов на субпопуляции.

- **Ко второму классу** следует отнести 16-20-параметровые анализаторы, так называемые 3-DIFF системы, способные дифференцировать лейкоциты на три субпопуляции.

- **К третьему классу** относятся так называемые 5-DIFF системы, способные дифференцировать лейкоциты по 5 популяциям и позволяющие определять до 28 параметров.

- **Четвертый класс** – анализаторы с модулем дифференцирования ретикулоцитов. Общее количество параметров, определяемых анализаторами с таким модулем доходит до 40.

- **Пробоподготовка**

  По способу подготовки проб гематологические анализаторы делятся на *полуавтоматические анализаторы*,
- В них подготовка проб отделена непосредственно от анализа и производится в специальных приборах — дилютерах.

  Вторая группа — *полностью автоматические анализаторы* — в свою очередь делится на еще две группы. Приборы **первой группы** позволяют работать только с предразведенной кровью, **вторая группа** анализаторов может работать непосредственно с цельной кровью. Для гематологического анализа может использоваться как капиллярная анализаторов может работать непосредственно с цельной кровью. Для гематологического анализа может использоваться как капиллярная, так и венозная кровь.

Производительность

- Приборы первых двух классов производят до 60 анализов в час.

- Приборы старшего класса имеют производительность от 60 до 120 анализов в час. Скорость работы приборов лимитирована как самой методикой исследования, так и особенностями подготовки проб.

- **Объем пробы**

  Современные гематологические анализаторы используются для анализа от 10 до 300 микролитров цельной крови. Более низкие объемы крови позволяют использовать систему в педиатрии, а также более экономно расходовать кровь, что дает возможность проведения повторных исследований. Кроме того, более низкие объемы проб снижают потребление реагентов.

- **Реагентная база**

  Помимо подготовки проб большое значение имеет реагентная база. Количество разных реагентов, используемых анализатором, существенно влияет на себестоимость и качество исследований.

- **Открытые системы**
  Анализаторы младших классов могут работать как реагентами, произведенными фирмой-изготовителем, так и с реагентами других производителей, что обычно не сказывается на аналитическом качестве исследования, но может существенно повлиять на работоспособность прибора.
  Закрытые системы - приборы могут работать только с реагентами, произведенными фирмой-изготовителем.

- **Система представления информации**

  Обычной формой предоставления результата являются абсолютные и относительные показатели, а также гистограммы и флаги. Использование флагов и гистограмм существенно упрощает расшифровку результатов анализа. Наличие у приборов специальных интерфейсов, позволяющих выводить информацию на принтер, внутри лабораторную сеть или отдельно стоящий компьютер, является в настоящее время обязательным требованием. Также важным является сохранение результатов исследования в памяти прибора.

Название

Поле режима подсчёта

Поле состояния системы

Count | Dog WB | Ready | 11:21

Current sample

Type: Dog

Animal:

Gender:

Age :

ID : 1

Time: 10-13-2005 11:19

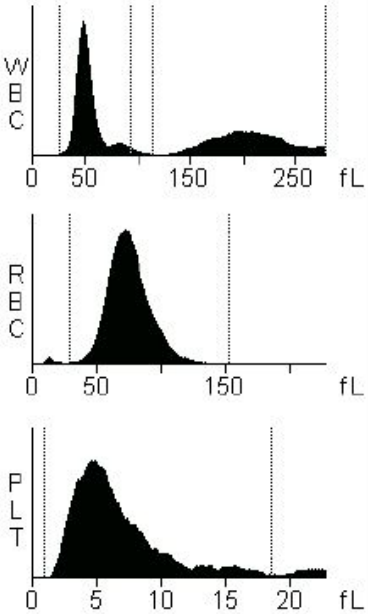
Mode: Whole Blood

Owner :

Next sample

ID : 2

WBC		11.7	$\times 10^9$/L
Lymph#	H	6.0	$\times 10^9$/L
Mid#		0.2	$\times 10^9$/L
Gran#		5.5	$\times 10^9$/L
Lymph%	H	51.2	%
Mid%	L	1.8	%
Gran%	L	47.0	%
RBC	L	4.72	$\times 10^{12}$/L
HGB		141	g/L
HCT		39.7	%
MCV	H	84.3	fL
MCH	H	29.8	pg
MCHC		355	g/L
RDW	H	14.3	%
PLT		250	$\times 10^9$/L
MPV		7.8	fL
PDW		15.8	
PCT		0.195	%



Reagents for: >99 Counts

MENU | [MODE]Select count mode,[F1]Next sample,[F2]Unclog,[F3]Startup.

Поле помощи

Зона состояния реагентов

Поле отображения ошибок

При выборе гематологического анализатора следует учитывать целый ряд факторов:

- Измеряемые параметры
- Метод исследования
- Производительность прибора
- Автоматическая или полуавтоматическая подготовка проб
- Объем пробы
- Реагентная база
- Удобная система выдачи информации
- Наличие программы контроля качества
- Совокупная стоимость владения

Контроль качества (КК) - система мер, направленных на количественную оценку точности, воспроизводимости и правильности лабораторных исследований

Сущность КК - сопоставление результатов исследования проб с результатами исследования контрольного материала и измерение величины отклонения.

Цели КК :

- Устранение систематических ошибок и сведение до минимума числа случайных ошибок.
- Достижение оптимальных стандартных условий исследования биологических жидкостей во всех КДЛ

Контроль качества должен быть:

1. Систематическим (по единым правилам), повседневным **- *анализ контрольных проб должен включаться в обычный ход работы лаборатории***
2. Охватывать все области измерений ***(норма, высокие и низкие патологические значения)***
3. Производиться в реальных условиях работы лаборатории ***(так же, как обычные пробы пациентов, т.е. тем же персоналом и в тех же условиях)***
4. Объективным ***(желательно «шифровать» контрольный материал, что бы исполнитель не знал, где опыт, а где контроль)***

CBC - 3D®

Контрольная кровь для анализаторов Beckman Coulter, Abbott Cell-Dyn, ABX и других. Стабильность в закрытой пробирке 105 суток, в открытой 14 суток. Поставляется в пробирках 5 ml для анализаторов с прокалыванием крышки или 2 ml с завинчивающейся крышкой для анализаторов с ручной подачей пробы.

Клетки (частицы) контрольной крови должны удовлетворять следующим требованиям:

отсутствие электропроводности;
сопоставимость по размерам с контролируемыми клетками;
сходная плотность;
стабильность размеров во времени;
химическая инертность.

Выпускаемая сегодня контрольная кровь представляет собой смесь, содержащую
стабилизированные эритроциты,
частицы латекса вместо лейкоцитов,
тромбоциты животных и пр.

Поэтому **стабилизированная кровь не является идеальным контрольным материалом**, т. к. у содержащихся в ней клеток изменены размеры, форма поверхности, реологические свойства и специфическая электропроводность.

Типы контрольных материалов для гематологических исследований

Наименование	Контроль параметров	Срок годности
Стандартный раствор гемоглобина	Гемоглобин	1 год
Гемолизат	Гемоглобин	1 год
Консервированная кровь	Параметры, указанные в паспорте к контрольному материалу	От 21 дня до 6 мес.
Суспензии (фиксированные клетки)	Эритроциты, тромбоциты, лейкоциты	От 6 мес. До 1 года
Окрашенные мазки крови	Лейкоцитарная формула	Несколько лет

Проточная цитометрия

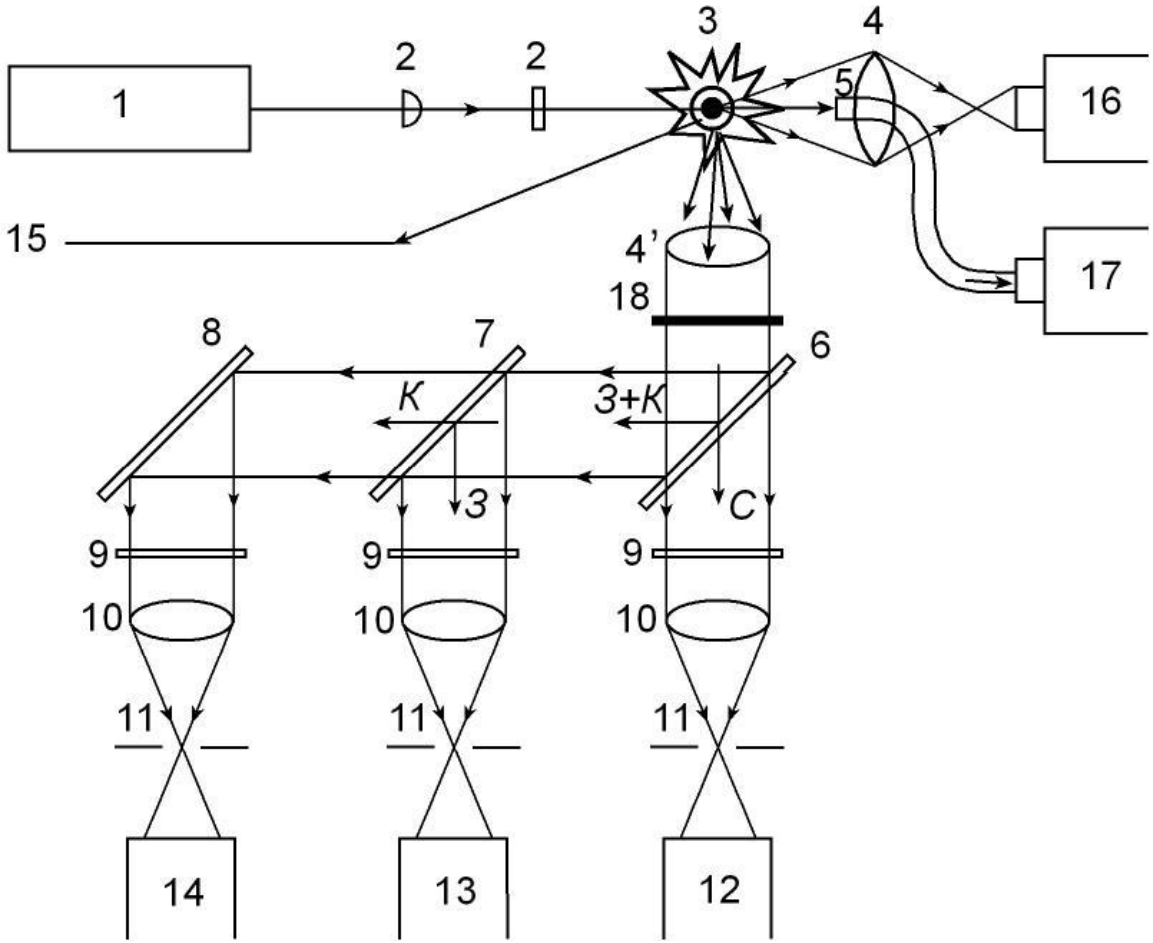
Flow Cytometer

Гематология сегодня – это проточная цитофлюориметрия

1. **Размер / объем клеток**
   - Импедансный метод (Метод Культера)
   - Проточная цитометрия - измерение прямого светорассеивания лазерного луча

2. **Внутренняя структура**
   - Проточная цитометрия - измерение бокового светорассеивания лазерного луча

3. **Содержание нуклеиновых кислот (РНК/ДНК, зрелость и метаболическая активность клетки):**
   - Проточная цитофлюориметрия



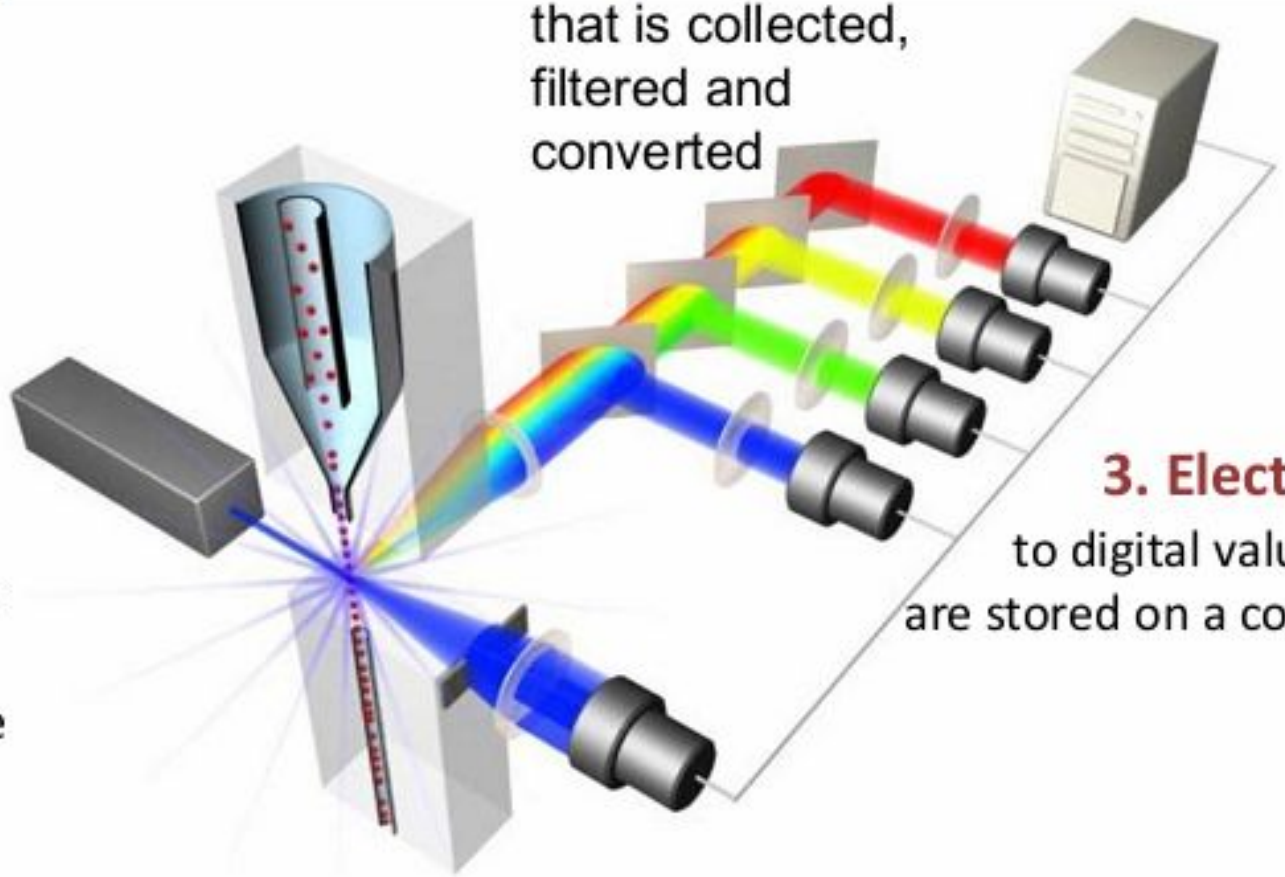
Оптическая схема цитометров, построенная по ортогональному принципу. 1 – источник света, 2 – линзы конденсора, 3 – проточная камера (поток с клетками идет перпендикулярно плоскости схемы), 4 – светособирающие линзы, 5 – световод для сбора ослабленного пучка света. 6 и 7 – светоделительные дихроичные пластинки, 8 – зеркало, 9 – барьерные фильтры с длинноволновым пропусканием, 10 – фокусирующие линзы, 11 – полевые диафрагмы, 12, 13, 14 – ФЭУ, 15 – сигнал от электрического датчика объема, 16 – фотодиод регистрации светорассеяния под малыми углами, 17 – фотодиод•регистрации ослабления светового пучка, 18 – экваториальная заслонка от отраженного света возбуждения

1. Fluidics

Cells in suspension flow in single-file through an illuminated volume where they scatter light and emit fluorescence

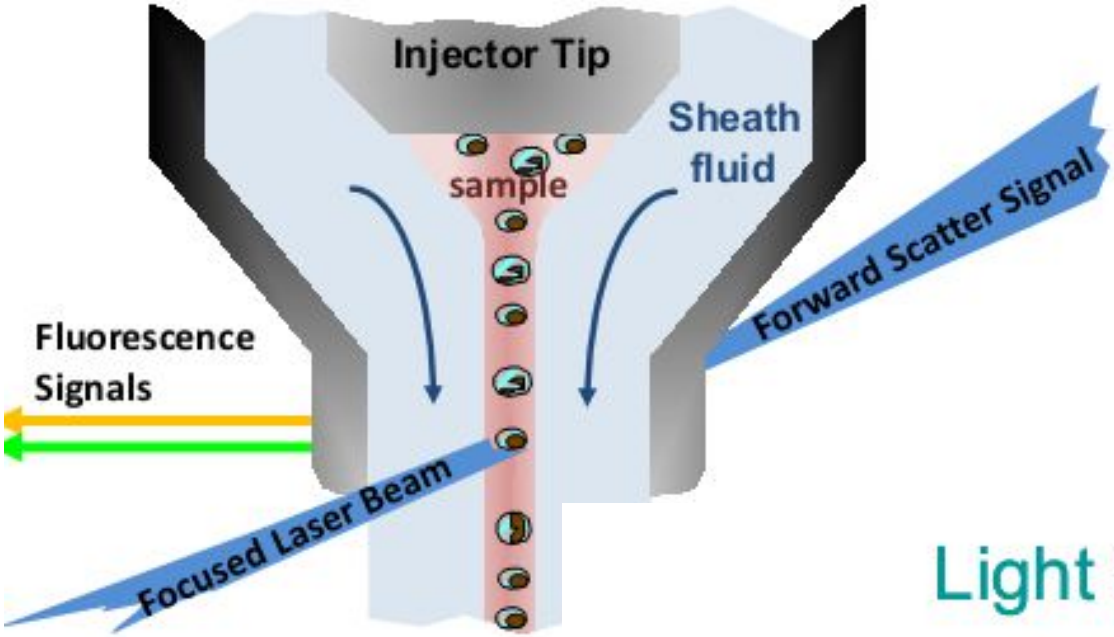
2. Optics

that is collected, filtered and converted

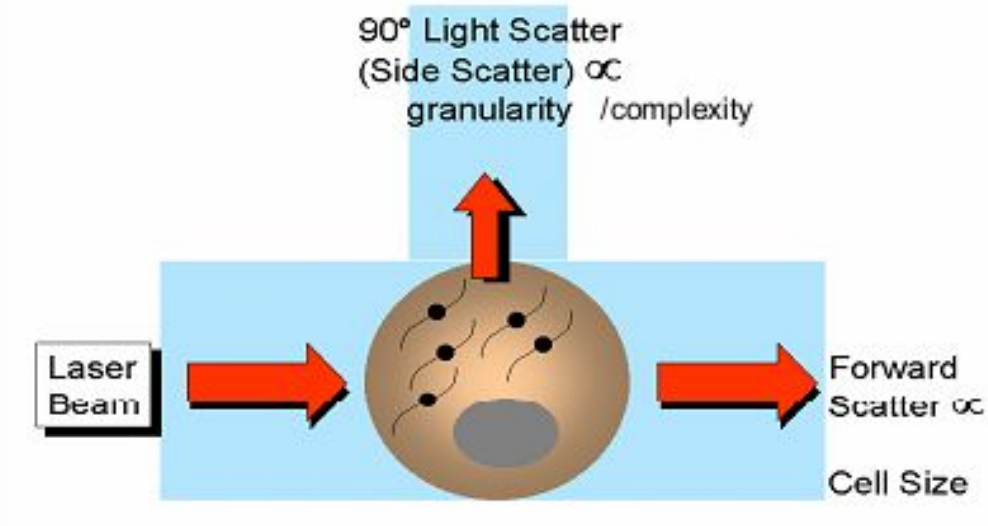


3. Electronics

to digital values that are stored on a computer



Light Scatter



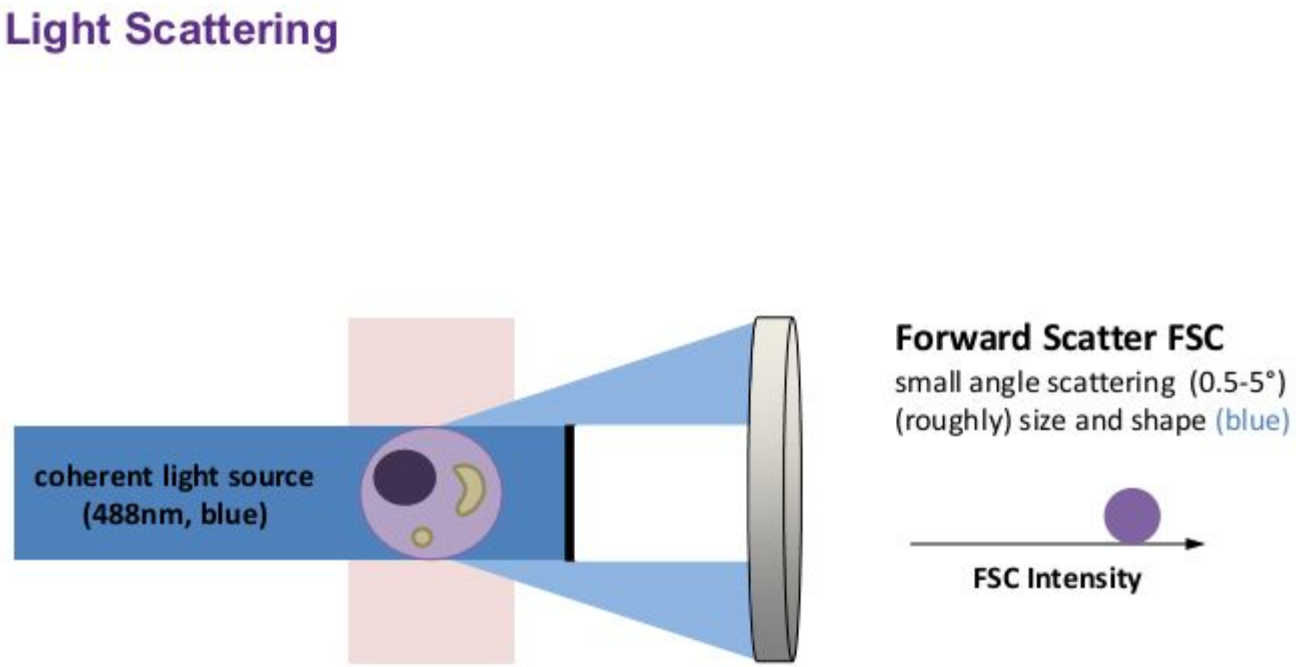
Проточная цитометрия.

- **Клетки крови можно дифференцировать на основе лазерной цитофлюорометрии. Искомые клетки, точнее их маркеры – CD-антигены, окрашивают флюоресцирующими антителами. Для окрашивания клеток (например, CD4+, CD8+-Т-лимфоцитов) применяют моноклональные антитела против их CD-антигенов, меченные флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТС), дающим зеленую флюоресценцию, или фикоэритрином, дающим красное свечение**.

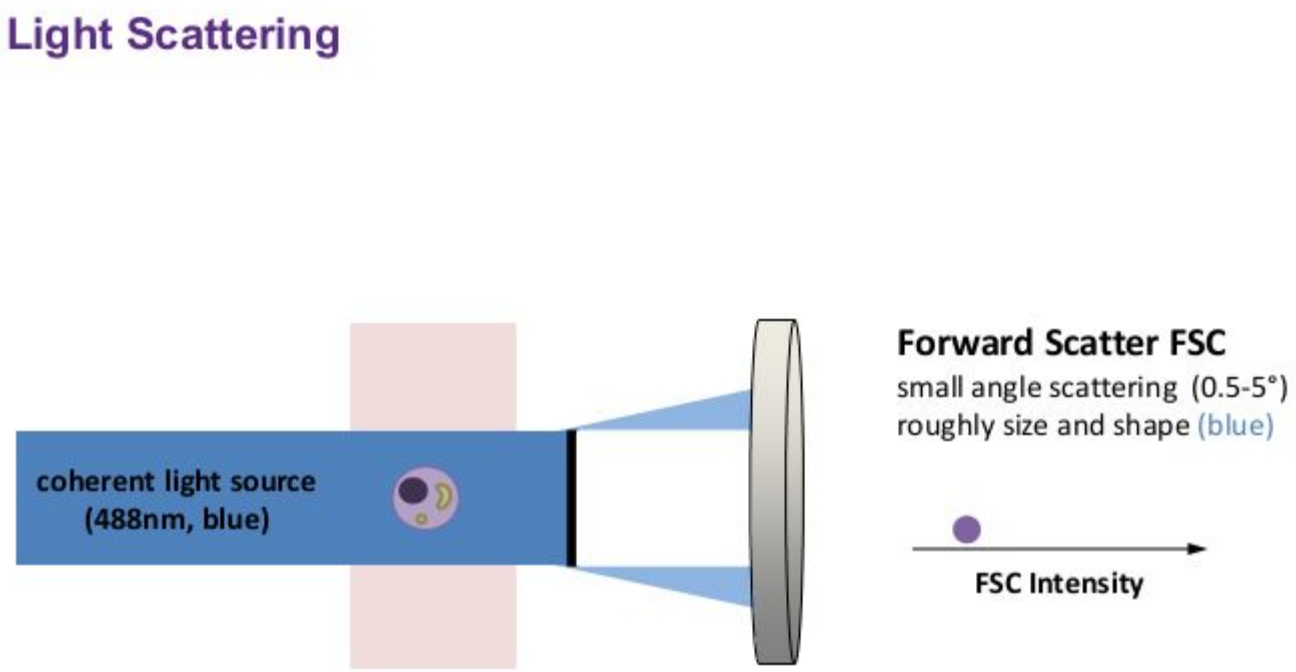
Образец крови после обработки меченными моноклональными антителами пропускают через тонкую трубку. Через исследуемый образец пропускают лазерный луч, который возбуждает свечение флюорохрома.

Фотоумножитель улавливает светорассеивание, по которому анализируется размер, гранулярность клетки, и регистрирует флюоресценцию, свидетельствующую о количестве меченых антител, связанных с клеткой. Интенсивность флюоресценции коррелирует с плотностью антигенов на поверхности клеток и может быть количественно измерена с помощью фотоэлемента. Полученные результаты преобразуются в гистограмму.

Определение размера

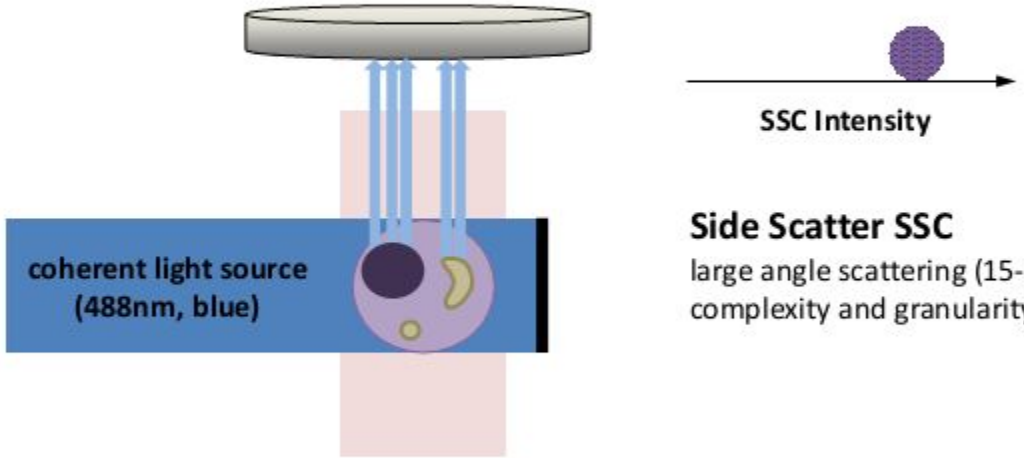


Определение размера



Определение структуры

Light Scattering

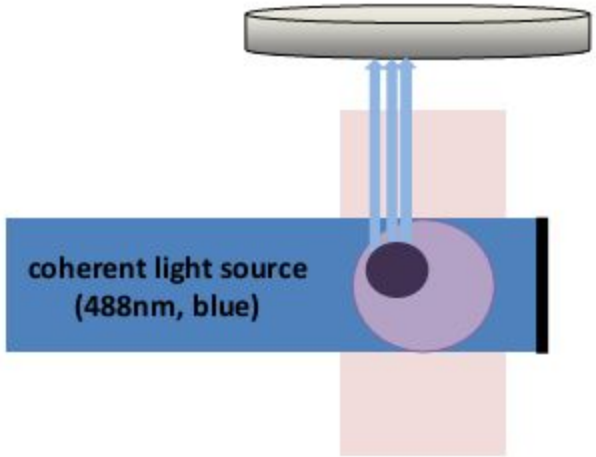


Side Scatter SSC

large angle scattering (15-150°), darkfield, complexity and granularity (blue)

Определение структуры

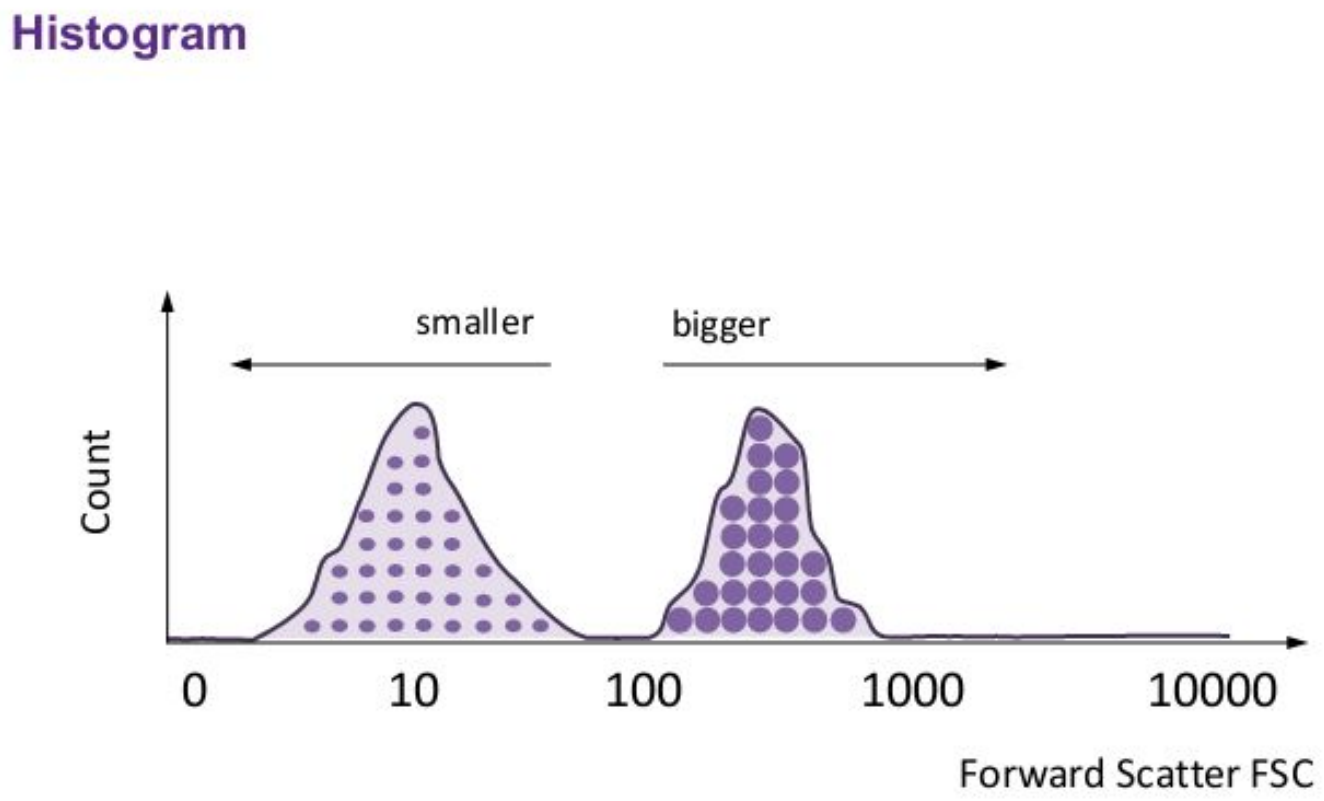
Light Scattering



Side Scatter SSC

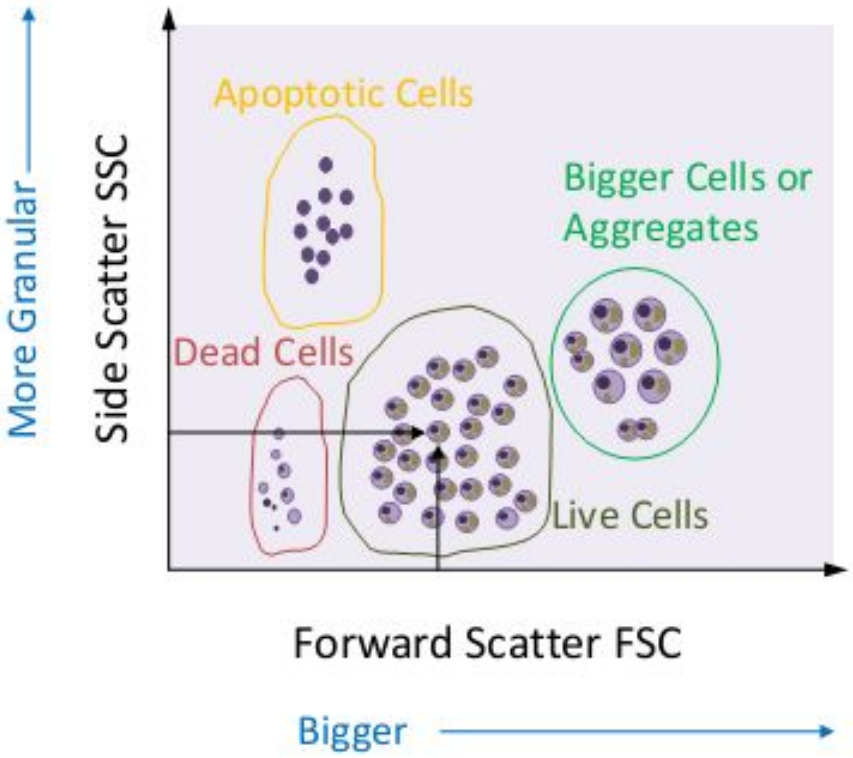
large angle scattering (15-150°), darkfield, complexity and granularity (blue)

Гистограмма распределения клеток по размеру



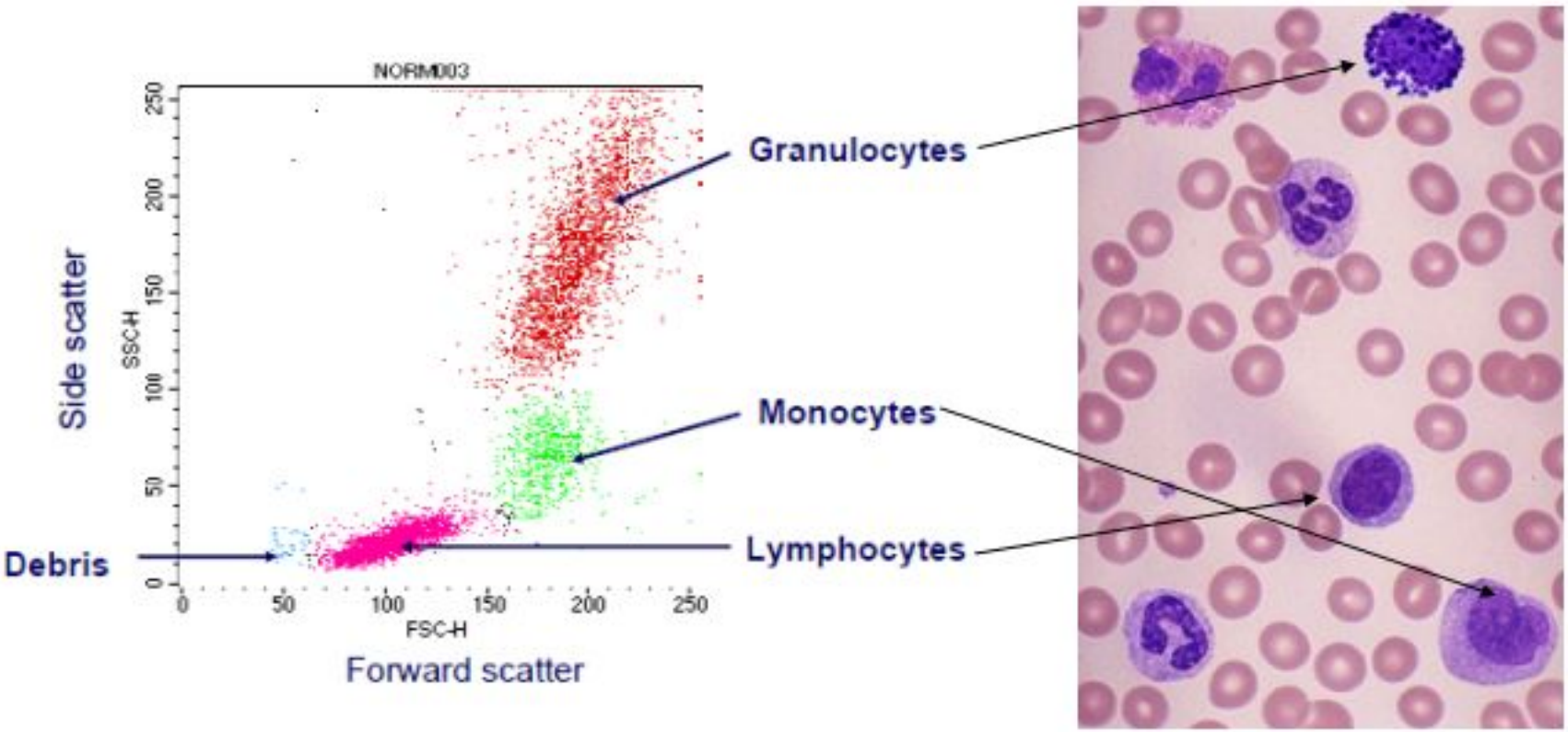
Скатерограмма

Dot Plot



Скатерограмма

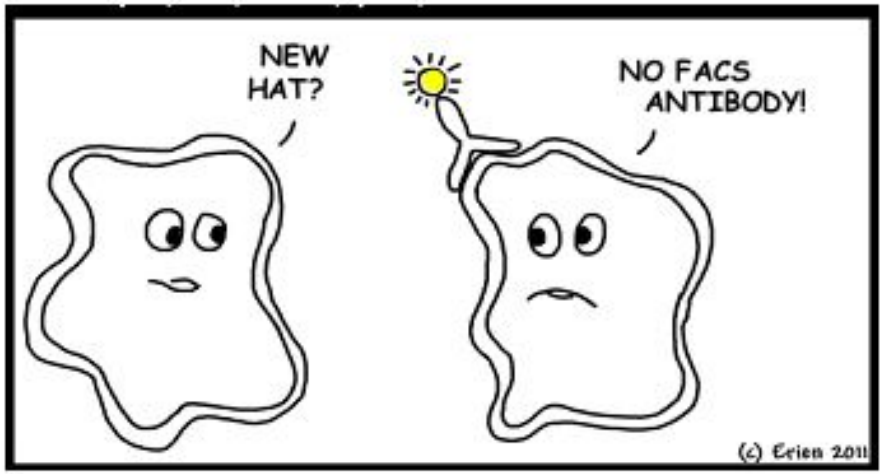
Light Scattering in Whole Blood



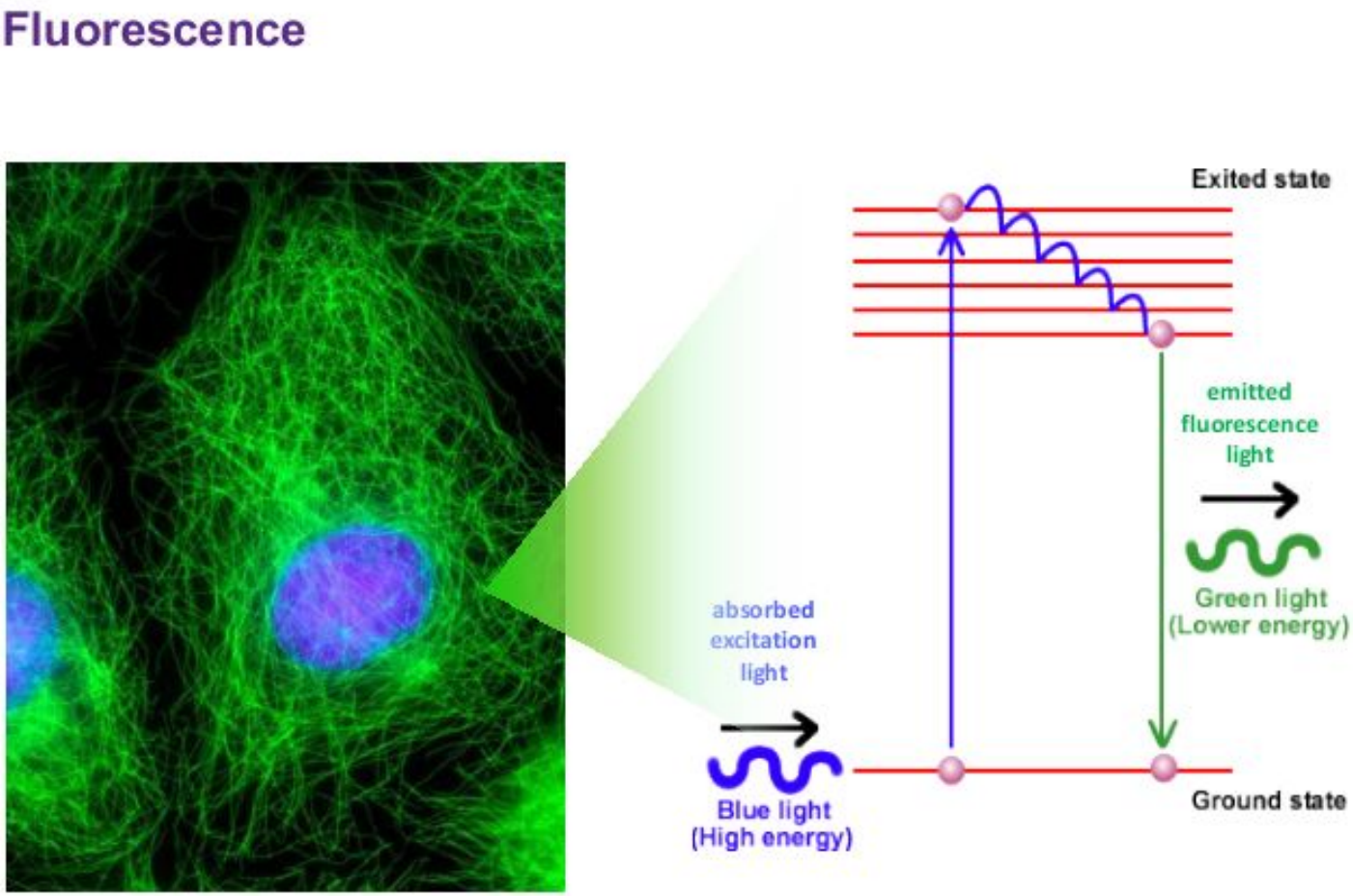
Регистрация флюоресценции

Colours

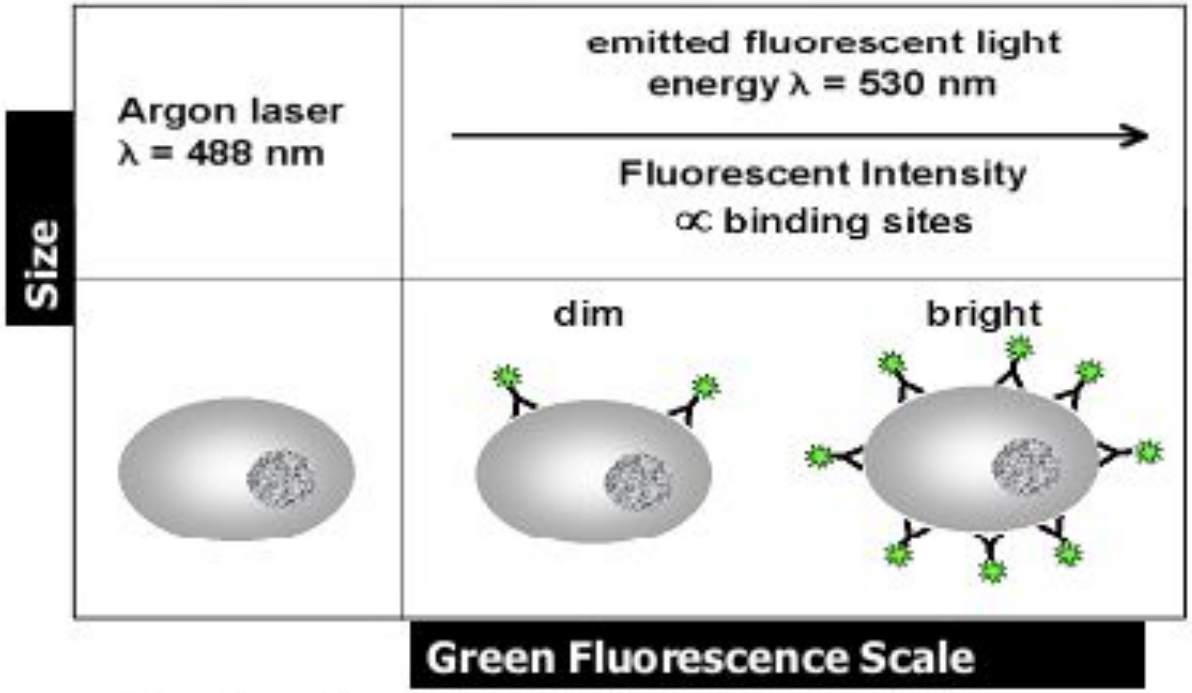
- Antibodies
- Fluorescent dyes
- Fluorescent proteins



Регистрация флюоресценции

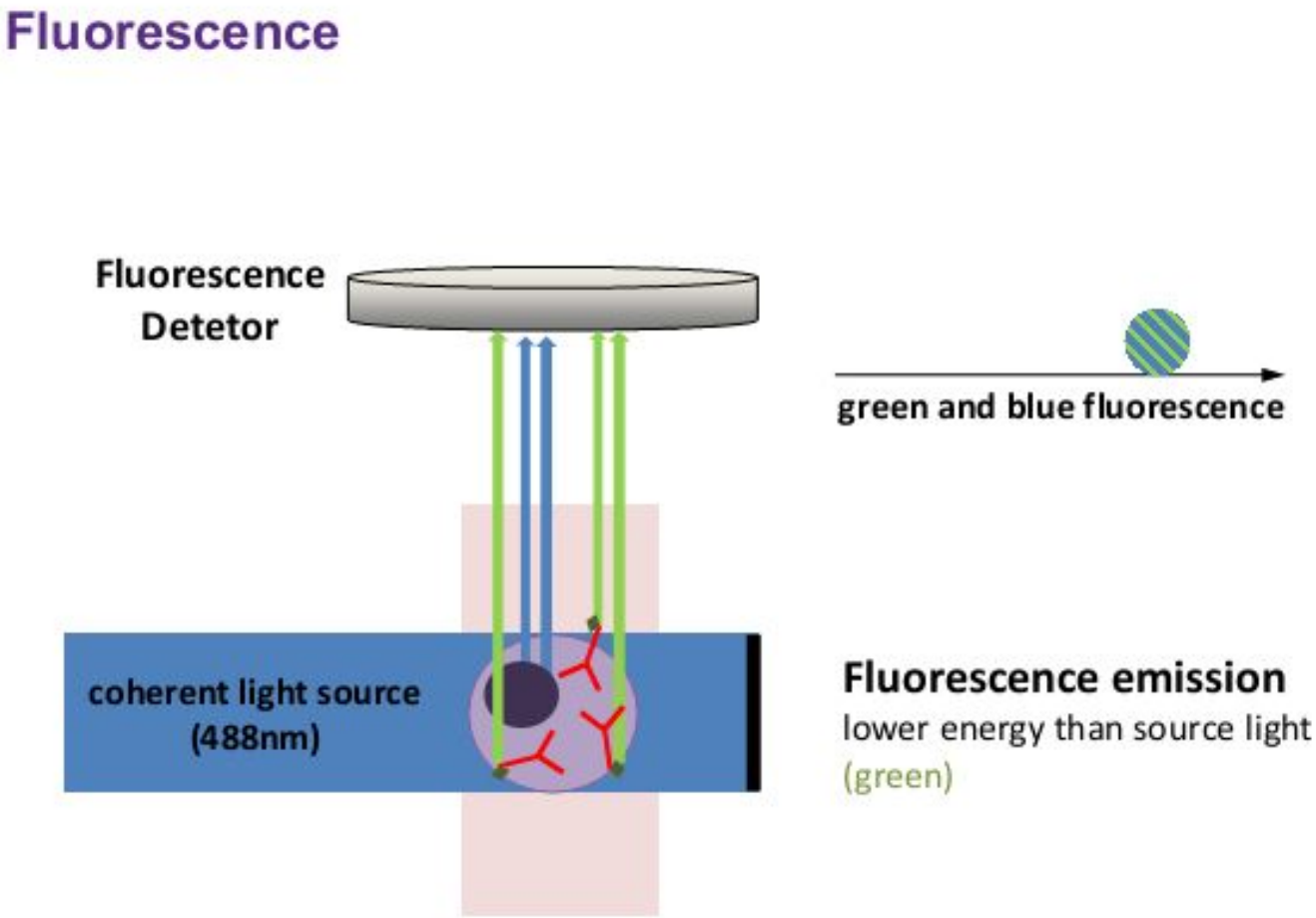


Регистрация флюоресценции



Fluorescent probes absorbs energy from laser
Releases absorbed energy by emission of photons at longer wavelength

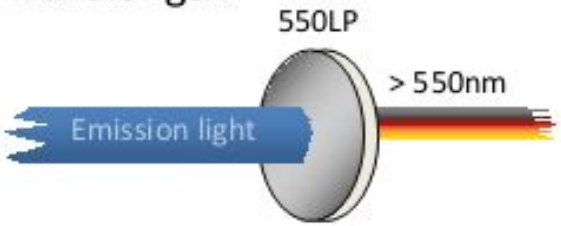
Регистрация флюоресценции

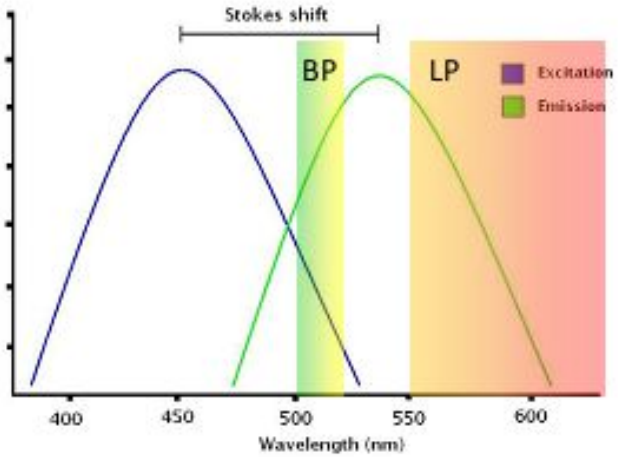


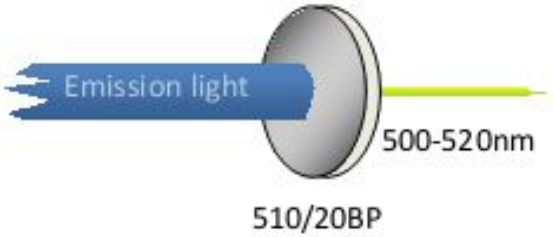
Регистрация флюоресценции

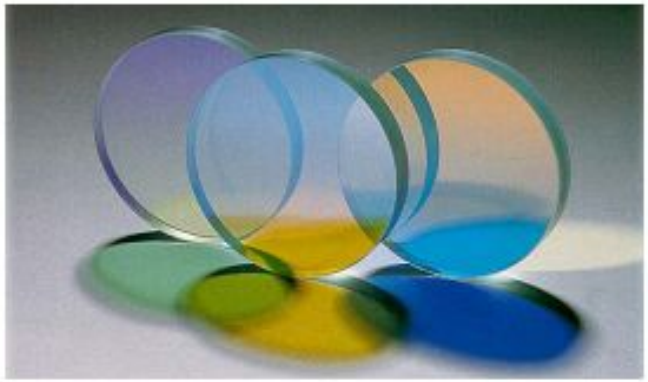
Filter Properties

Long-pass filters transmit wavelengths above a **cut-on** wavelength





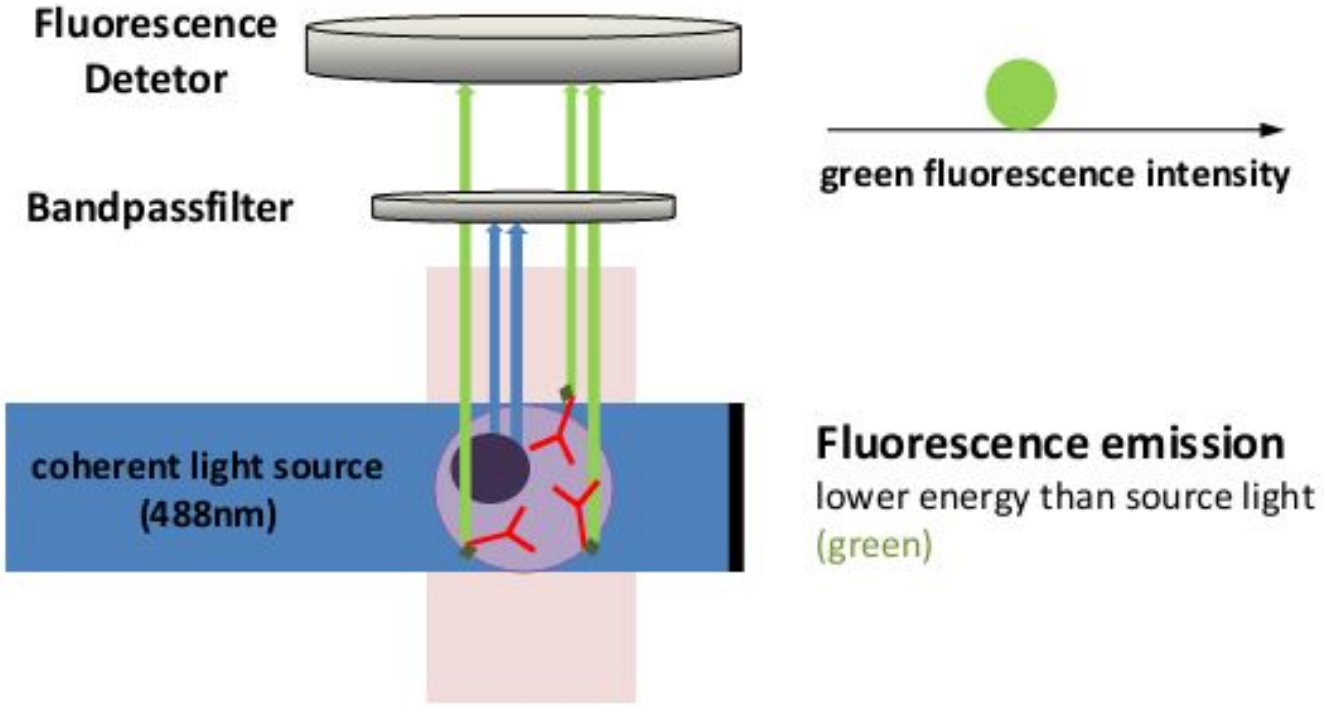




Band-pass filters transmit wavelengths in a narrow range around a specified wavelength

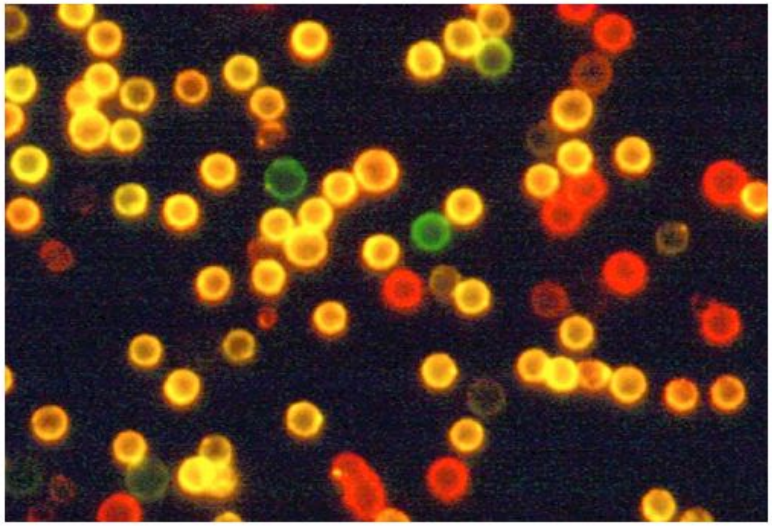
Регистрация флюоресценции

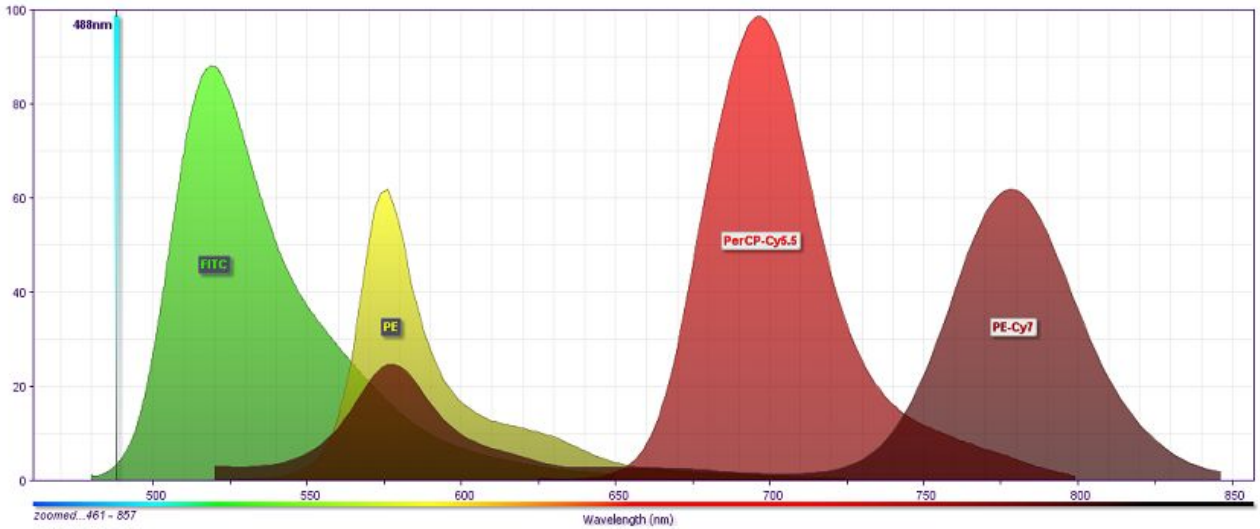
Fluorescence



Регистрация флюоресценции

More Fluorescent Parameters…

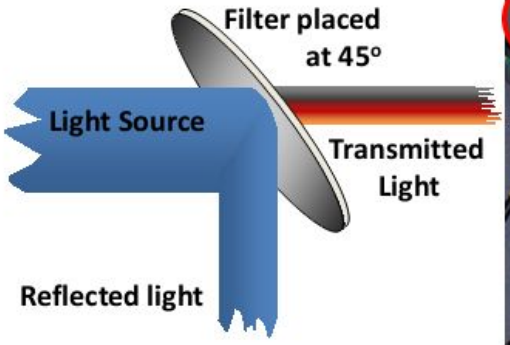


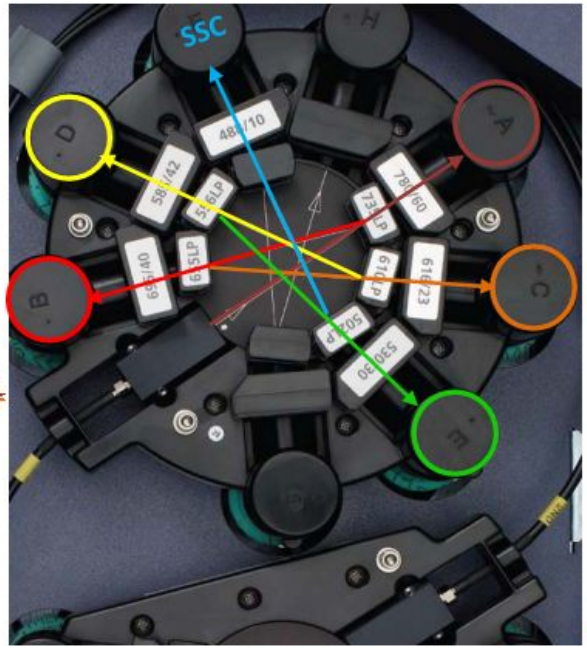


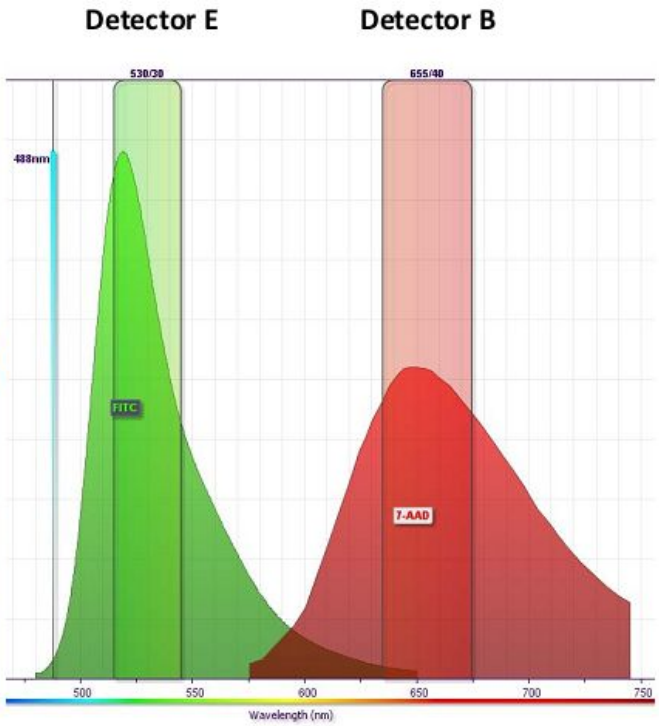
Регистрация флюоресценции

Dichroic Mirror

At an other angle the filter can be used as a **dichroic filter** or **dichroic mirror**



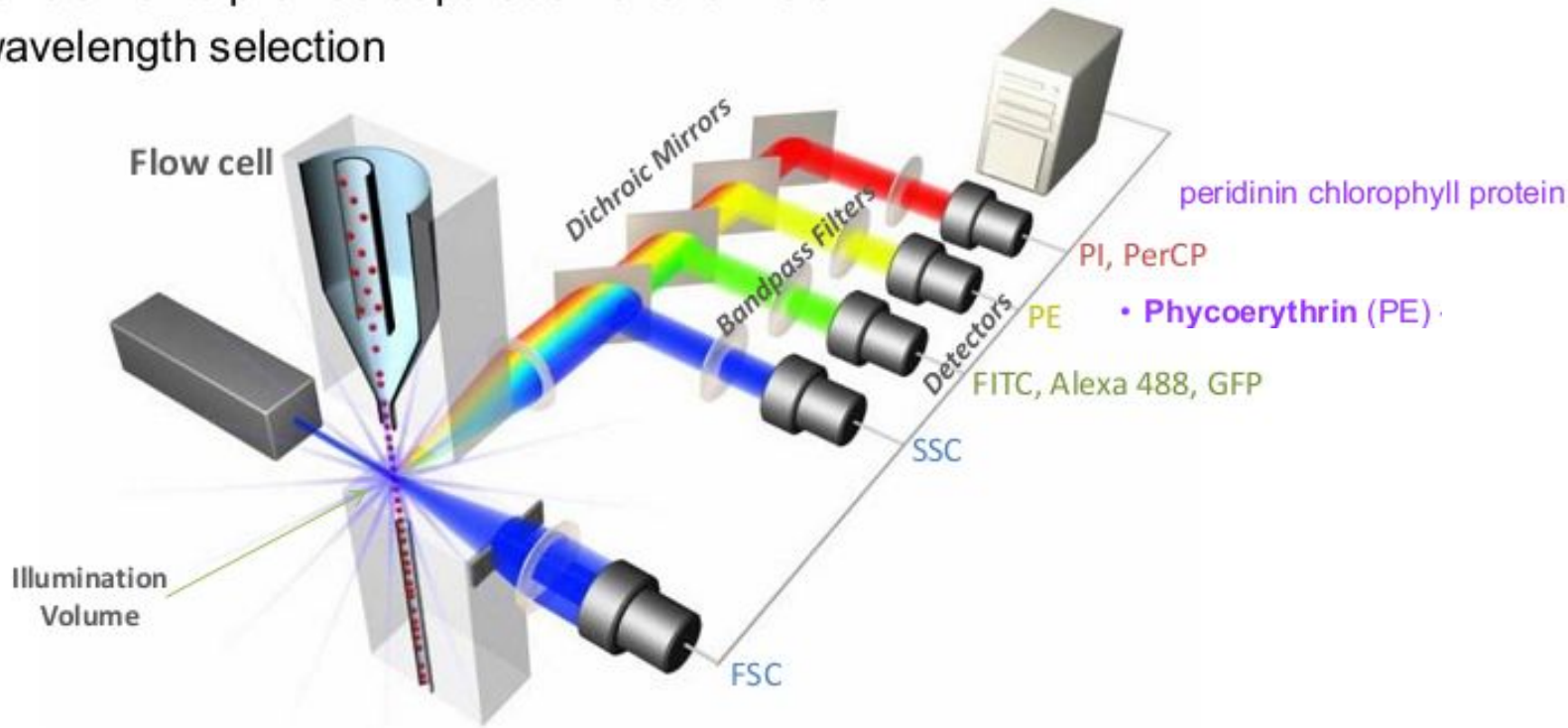




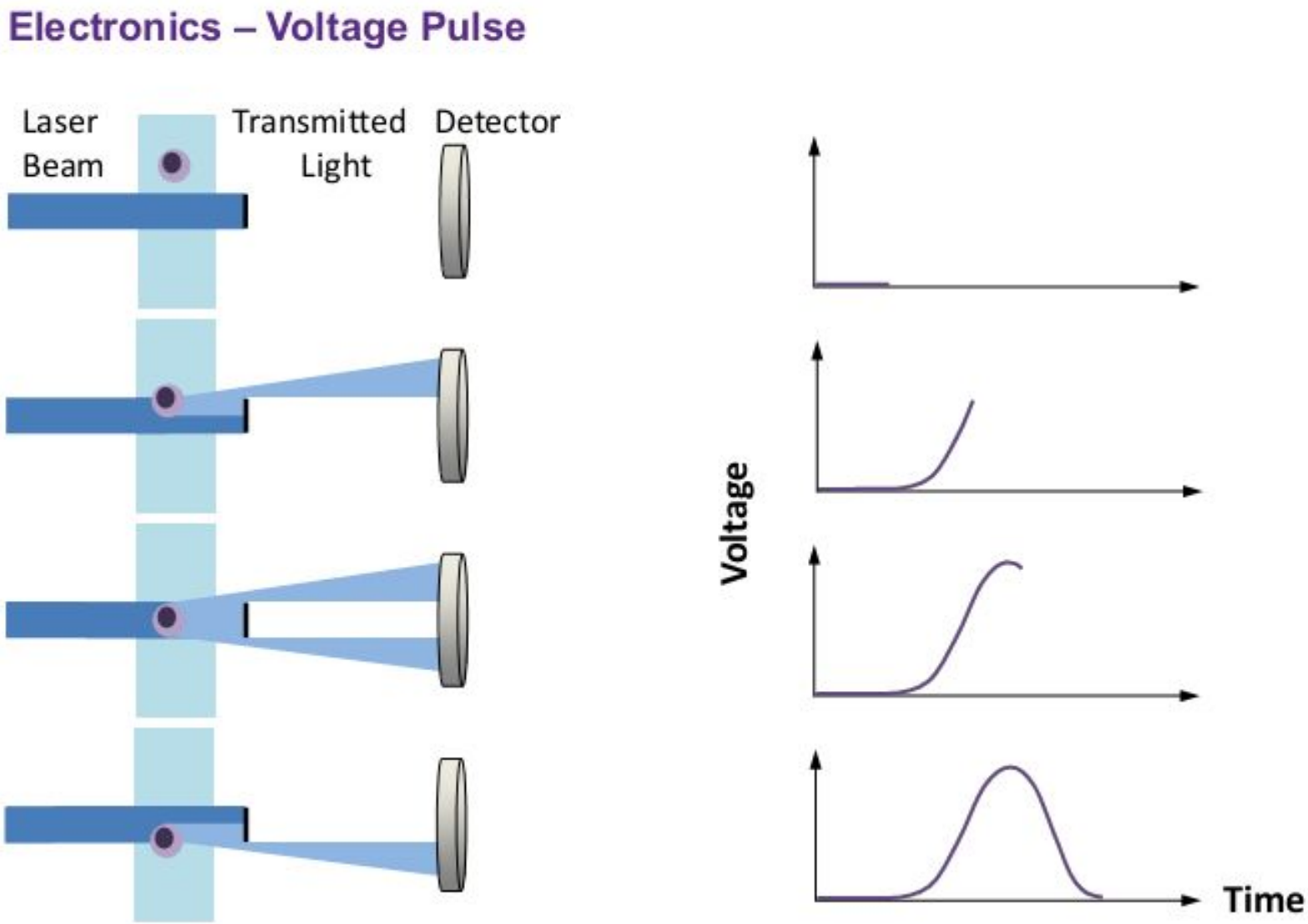
Регистрация флюоресценции

Channel Layout of a laser-based Flow Cytometer

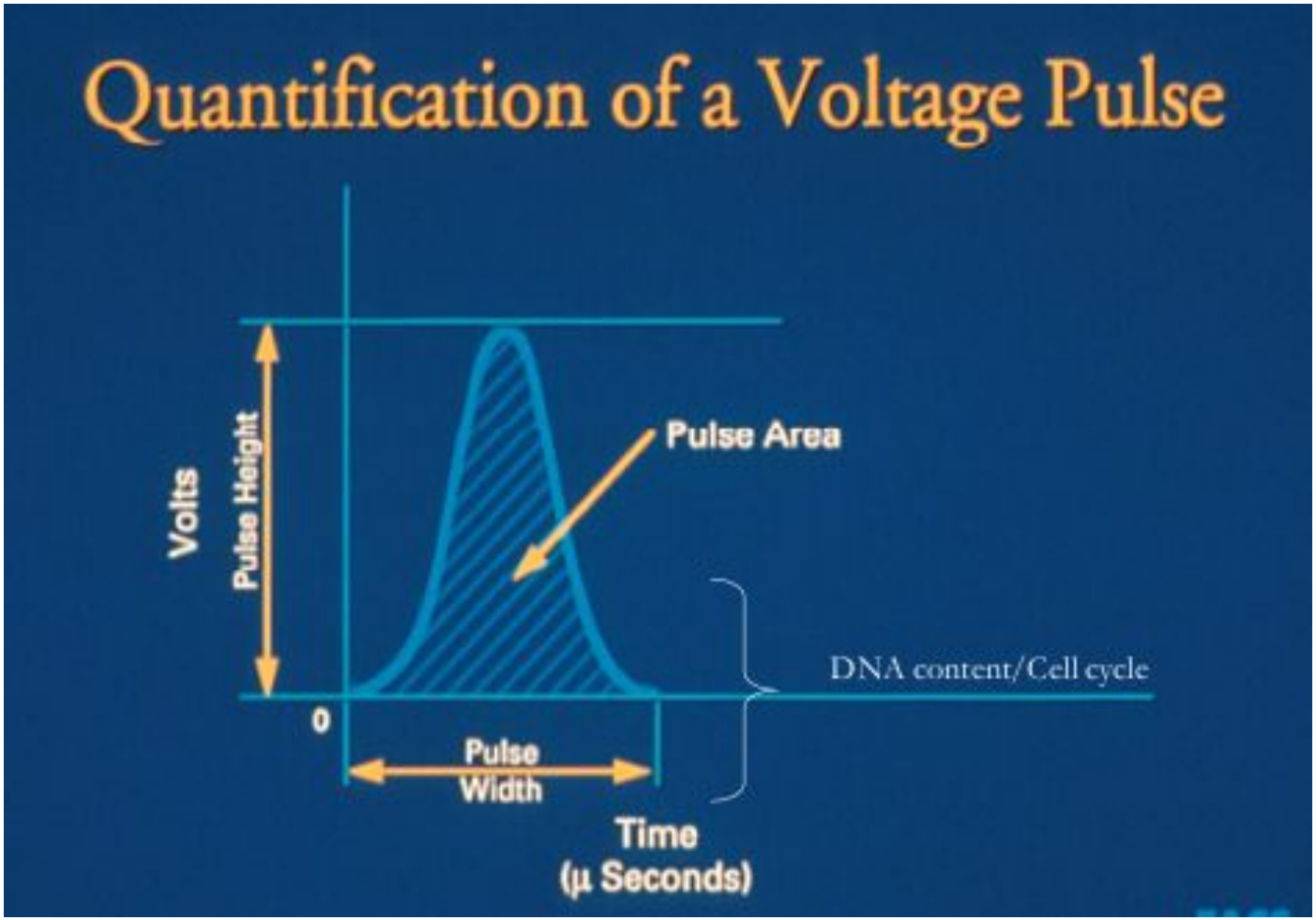
- Photon-distribution to detectors according to energy-levels (wavelengths)
- Optical elements provide separation of channels and wavelength selection



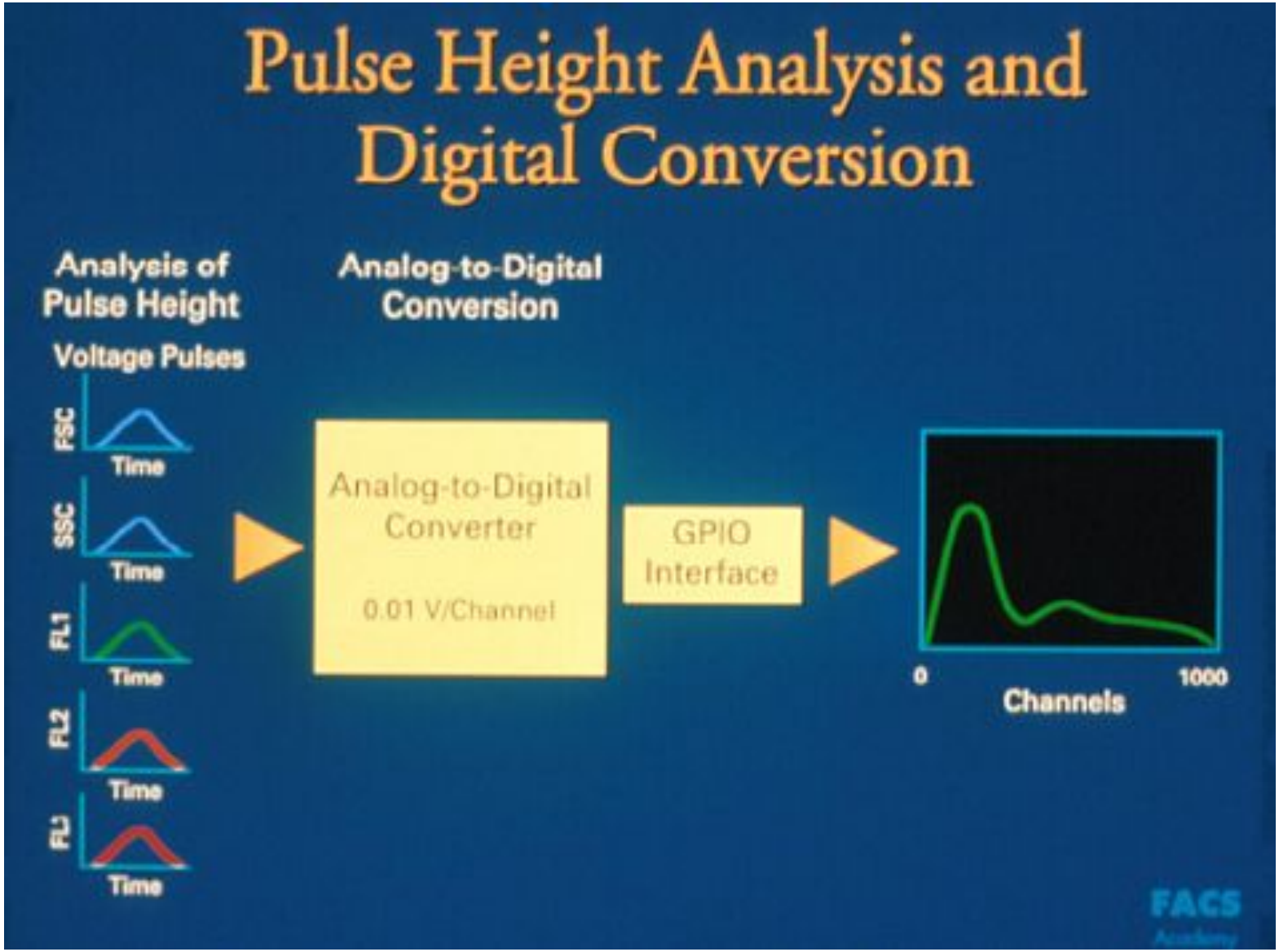
Регистрация флюоресценции



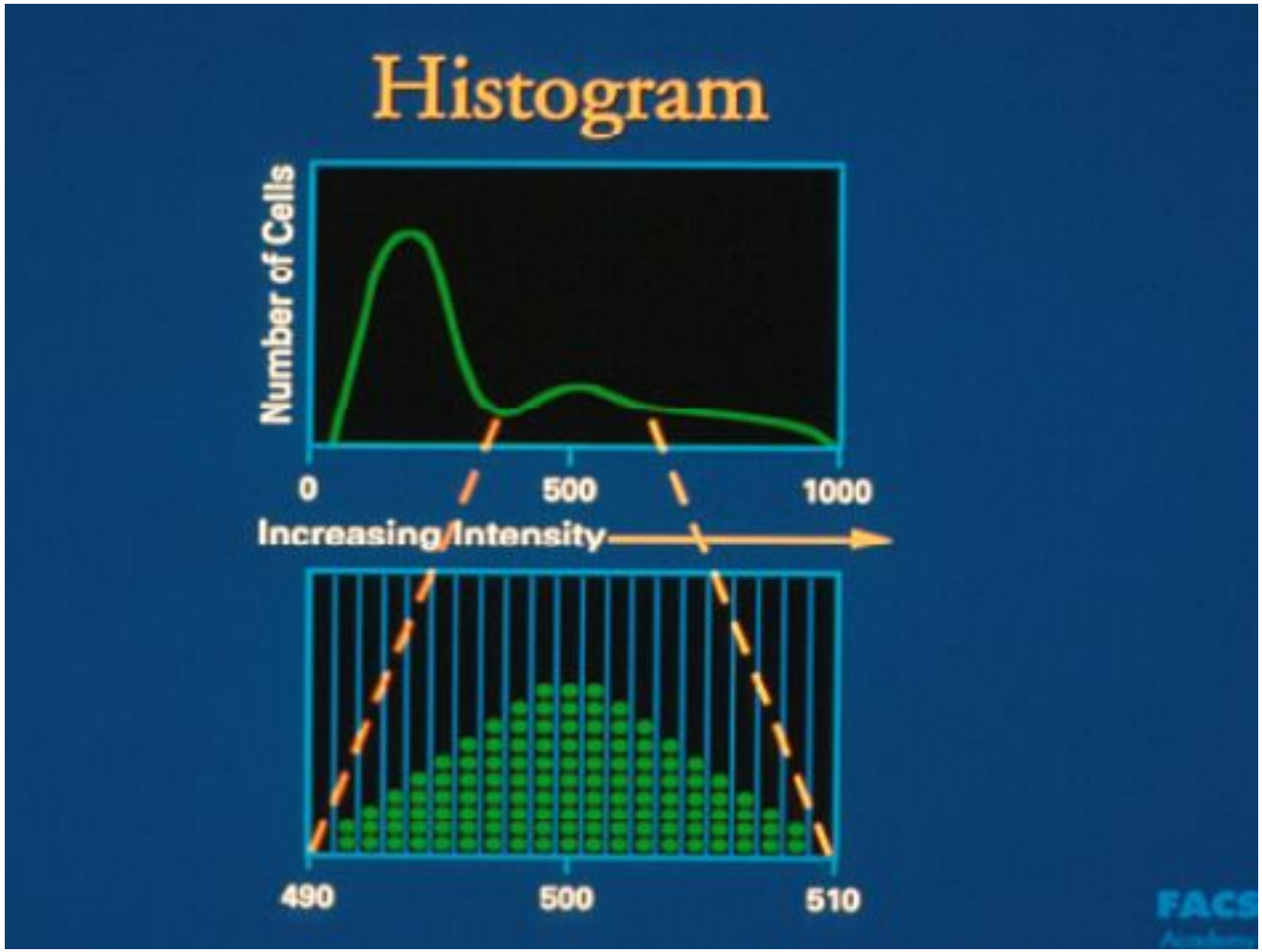
Регистрация флюоресценции



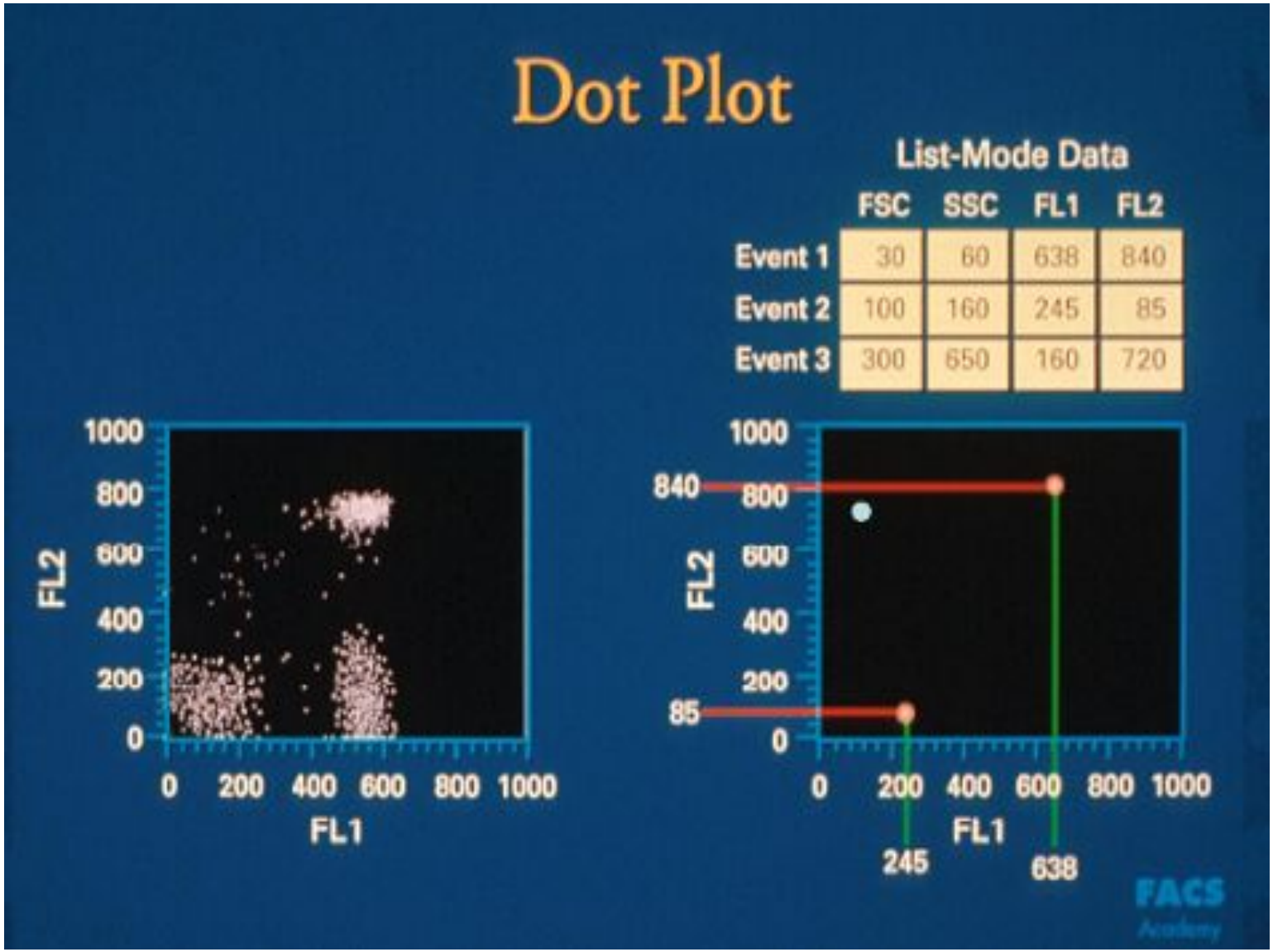
Регистрация флюоресценции



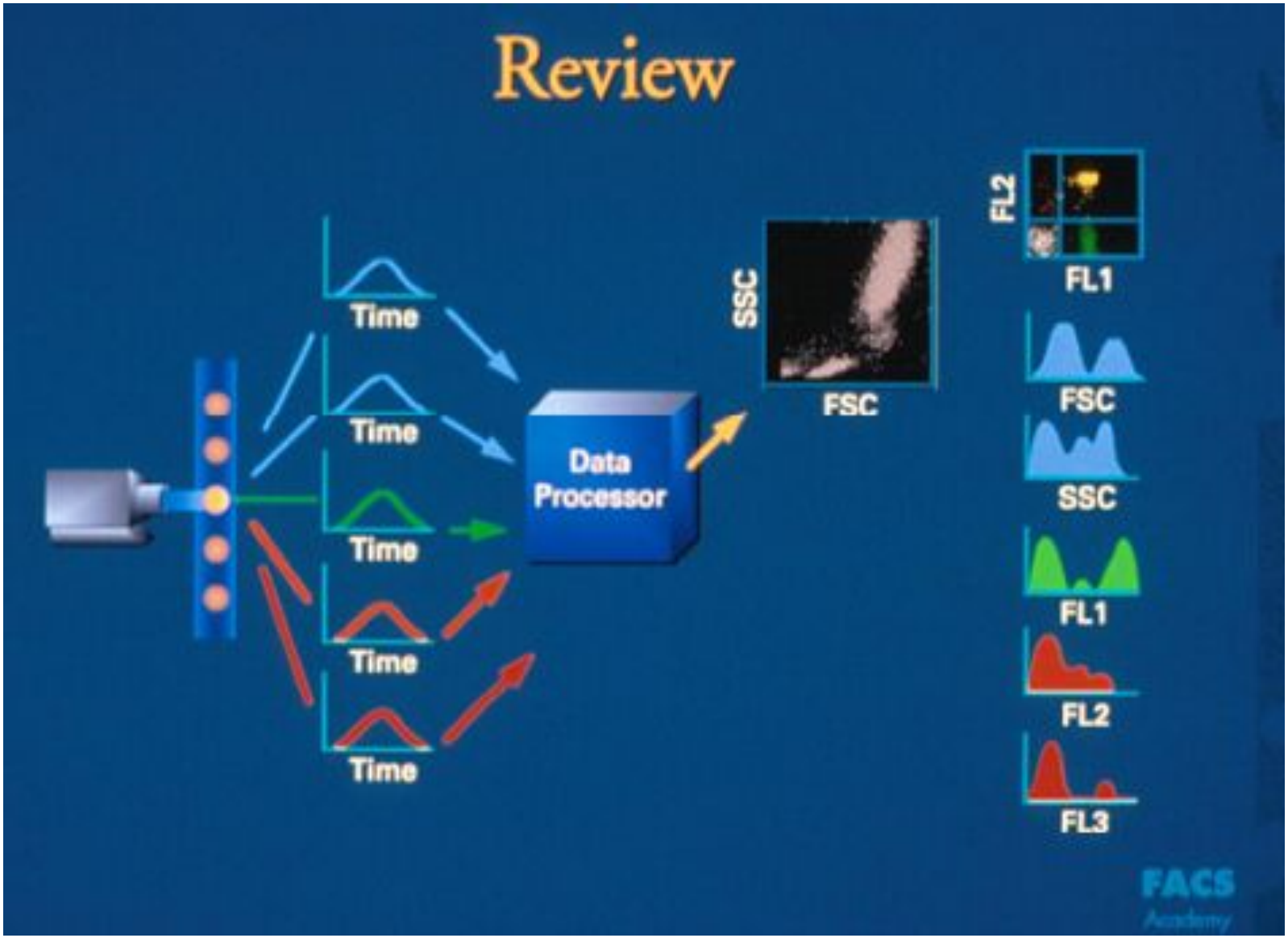
Регистрация флюоресценции



Регистрация флюоресценции

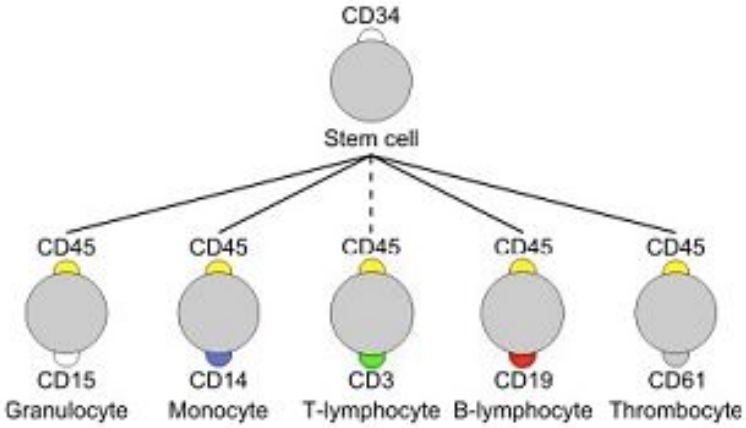


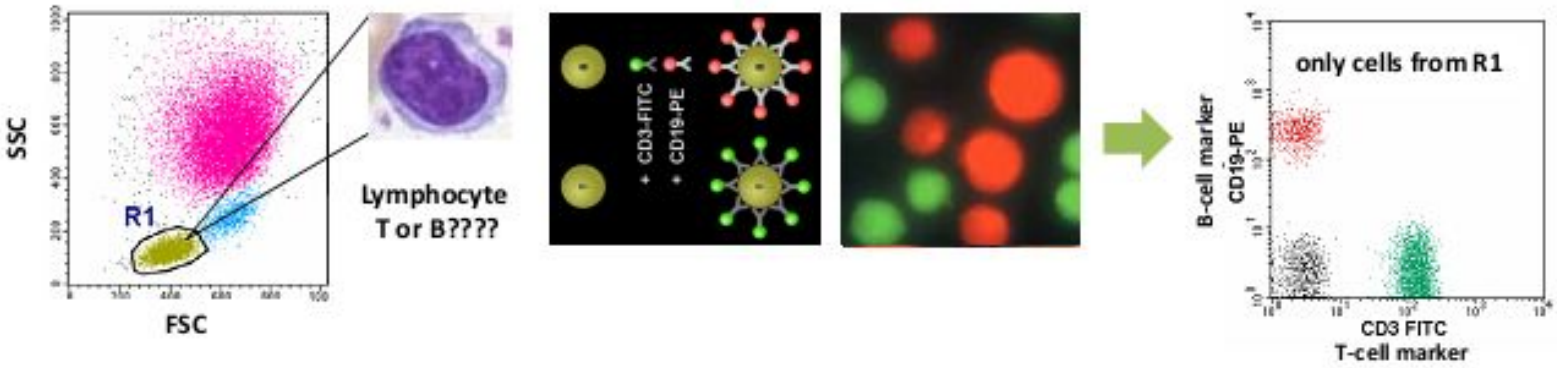
Регистрация флюоресценции



Application: Immunophenotyping

- Detection of cell surface molecules as example cluster of differentiation

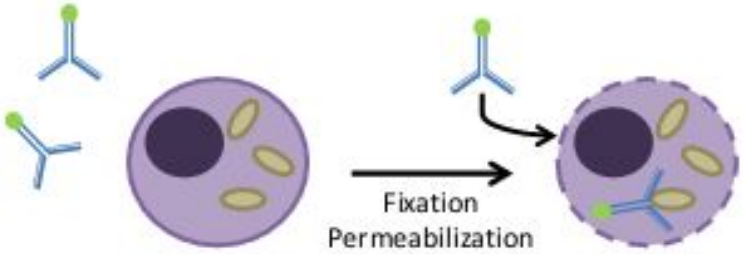


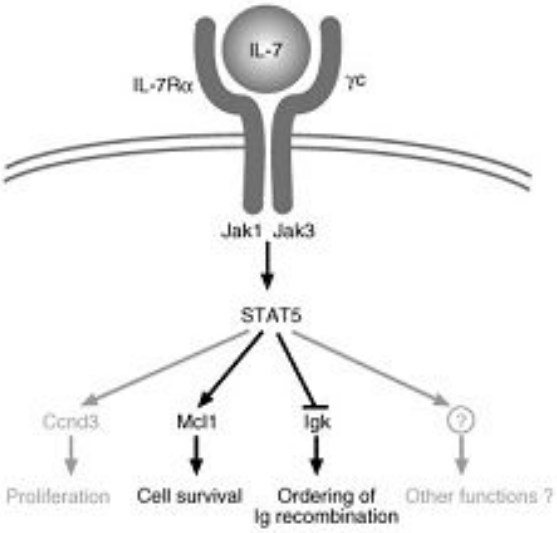


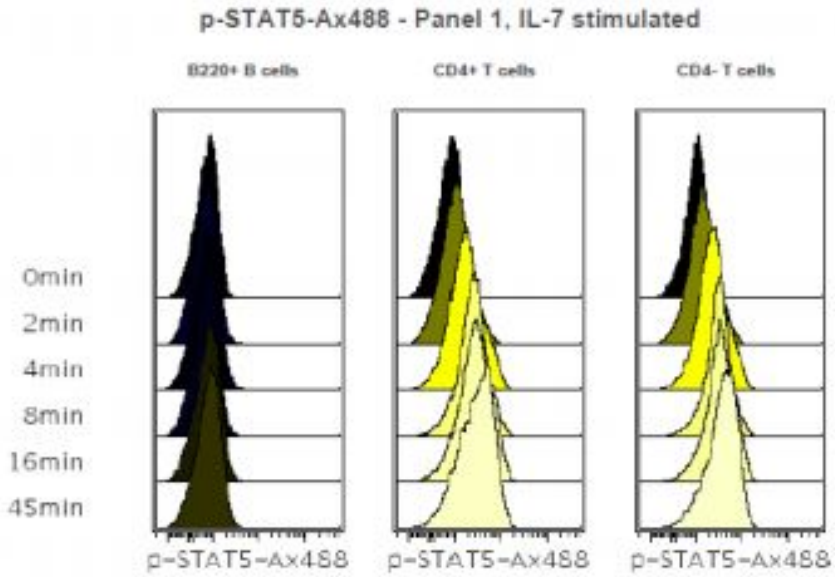
www.med4you.at

Application: Cell function

- Intracellular staining of cytokines, cytoskeleton, enzymes, transcription factors, signaling molecules



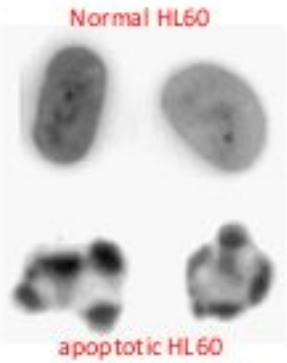


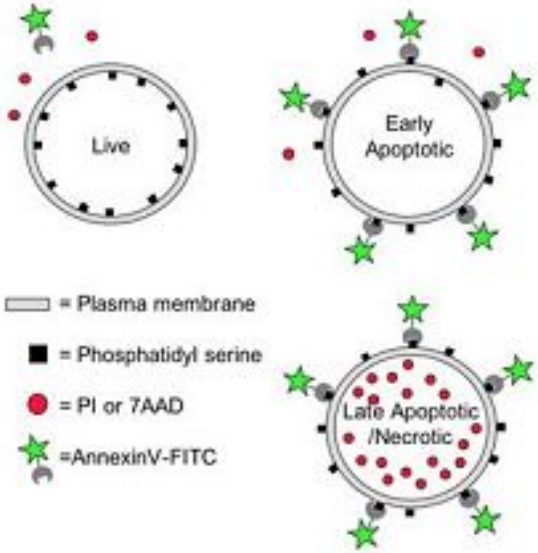


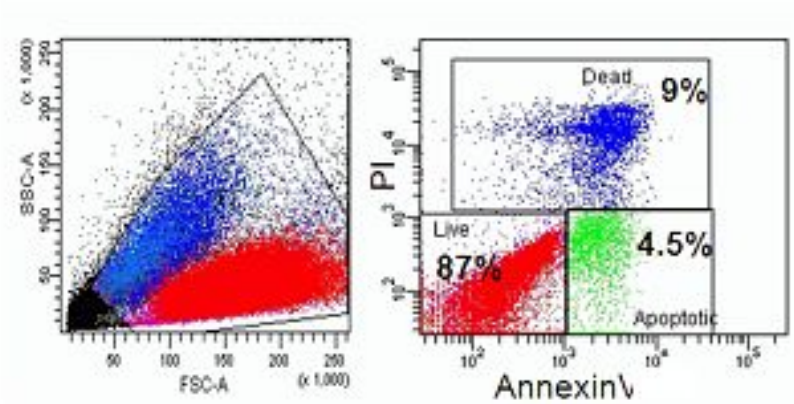
Application: Cell Death

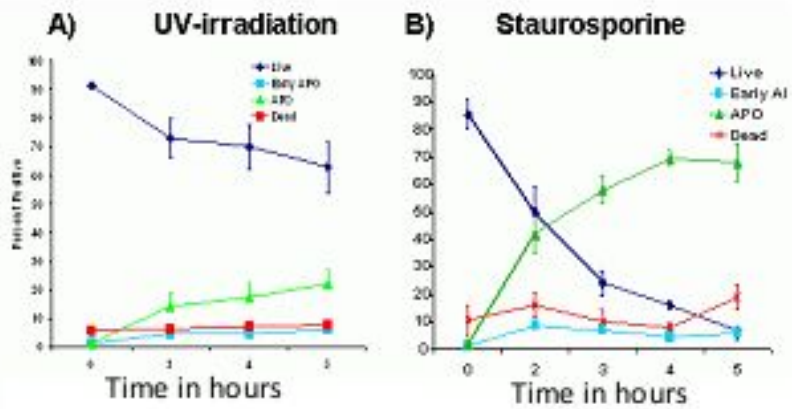
Measurements of cell death:

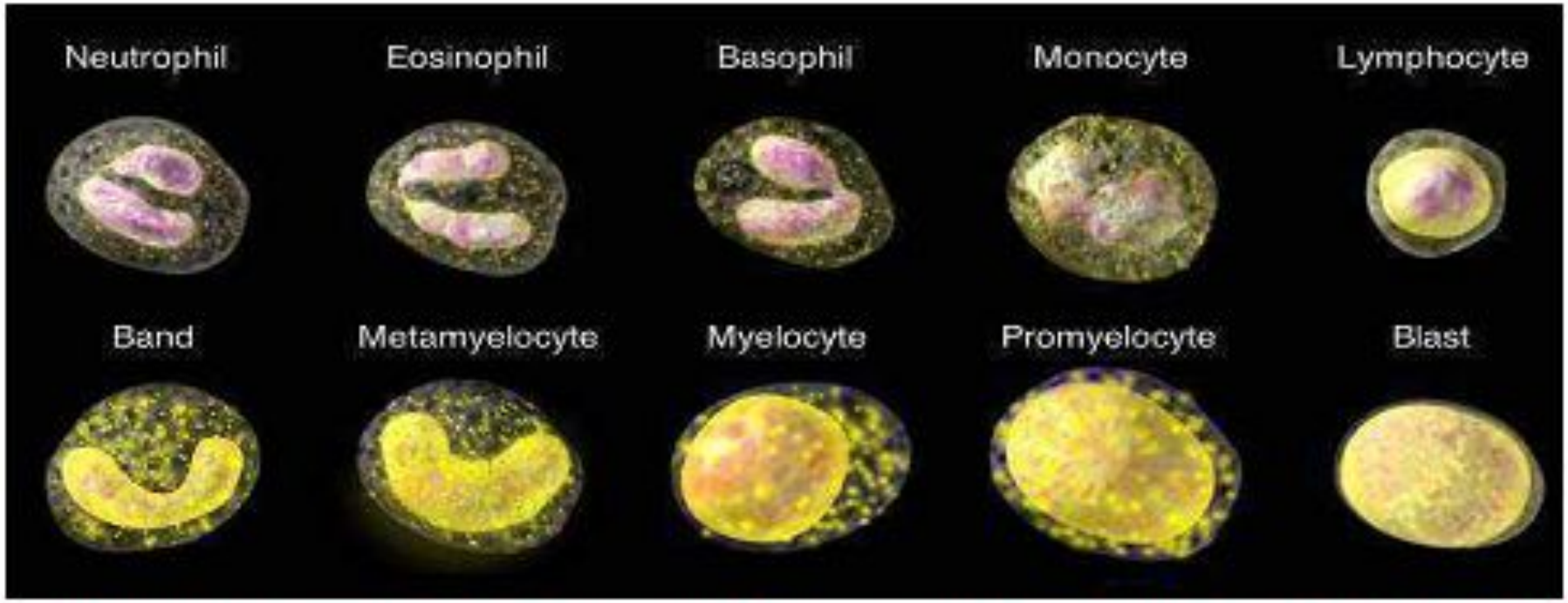
- Expression of proteins involved in apoptosis
- Activation of caspases
- Changes in the mitochondrial membrane potential
- **Changes in the plasma membrane**
- Cell shrinkage
- Chromatin changes
- DNA degradation







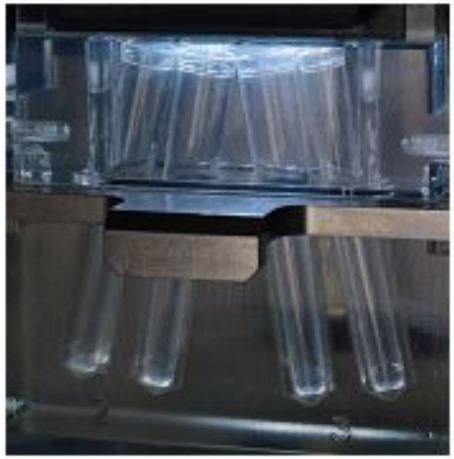


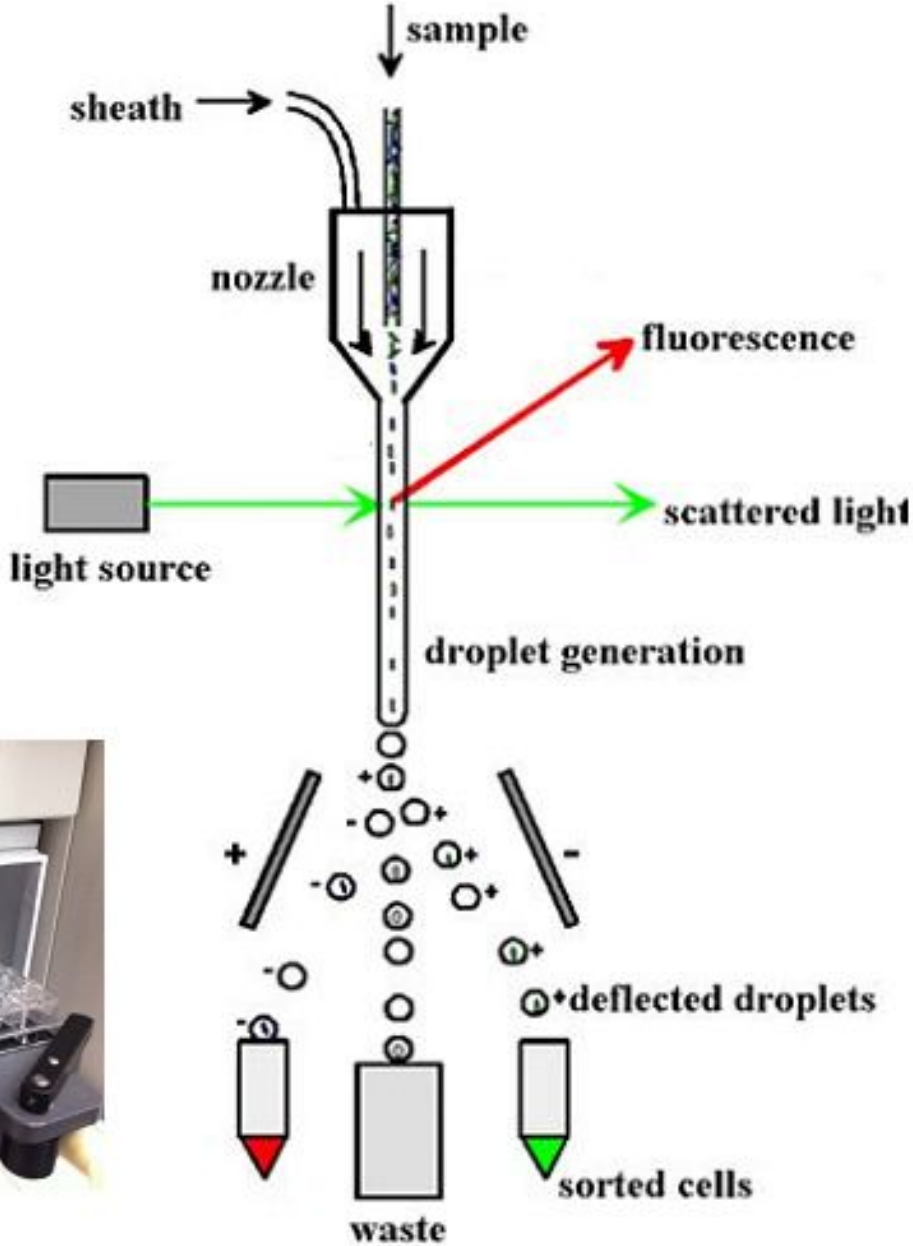


Флюоресцентное окрашивание нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) – концентрация нуклеиновых кислот в клетке прямо пропорциональна величине флюоресцентного сигнала

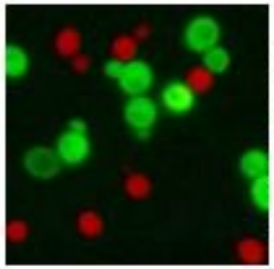
Principle of Sorting

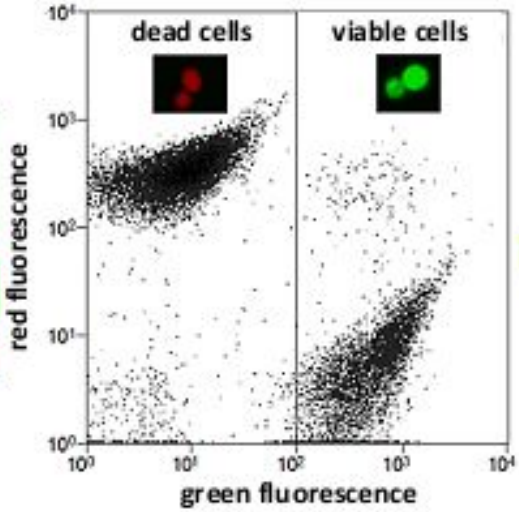
- Sorting (separating) cells based on properties measured in flow is also called **Fluorescence-Activated Cell Sorting FACS**



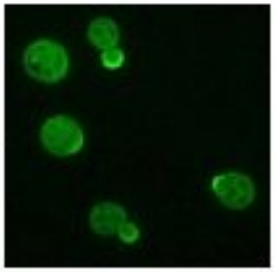


Application: Sorting

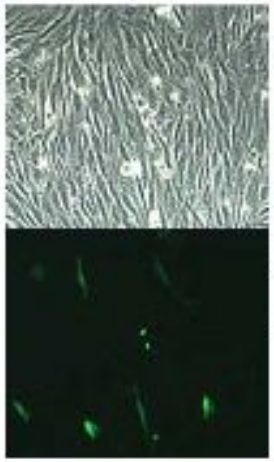


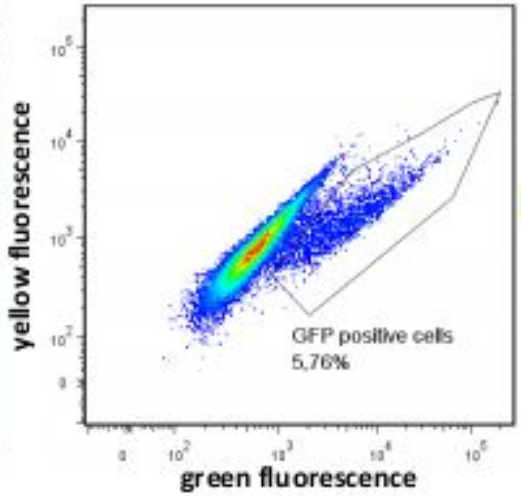


sort

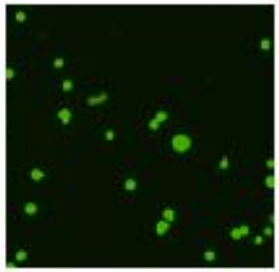


analysis





sort



culture

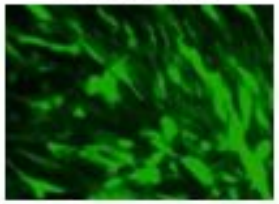
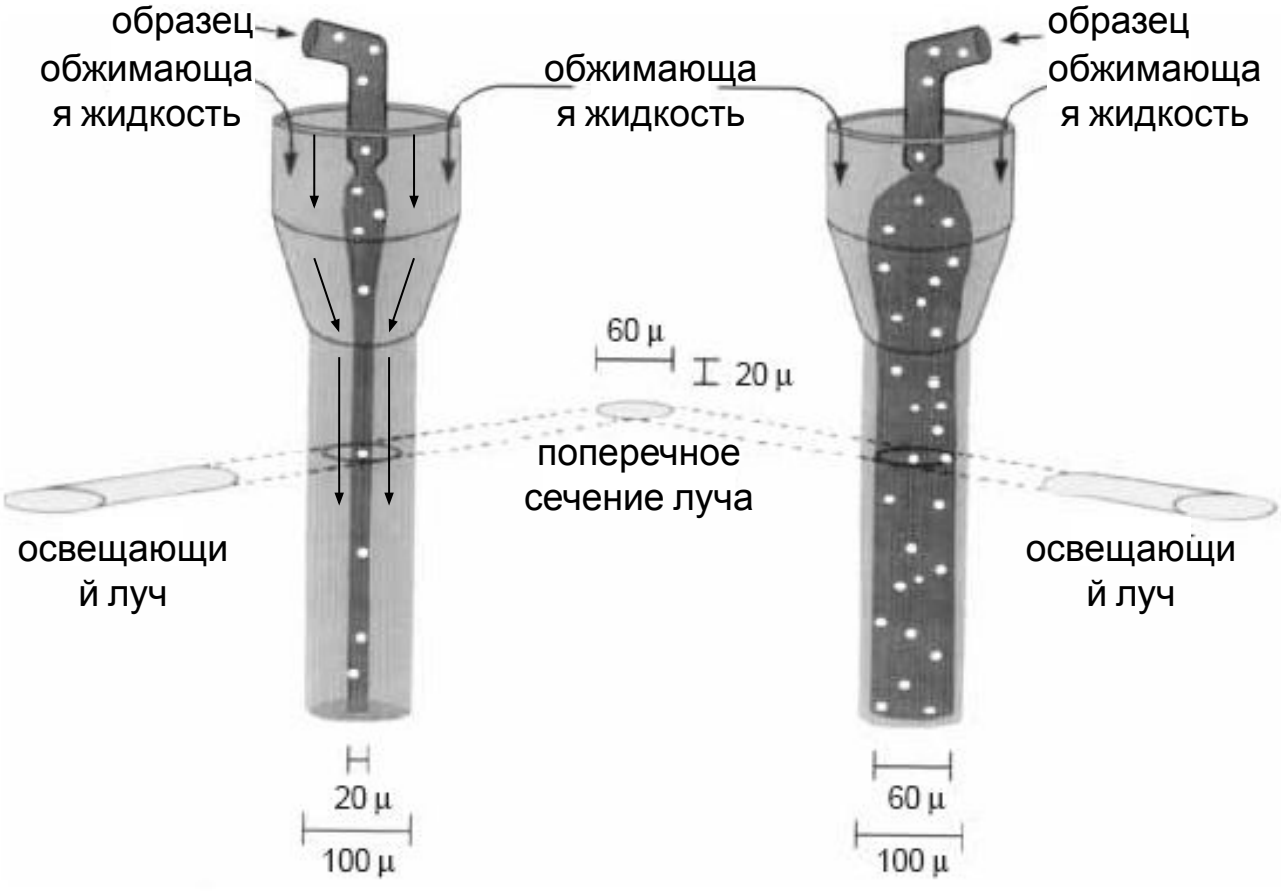
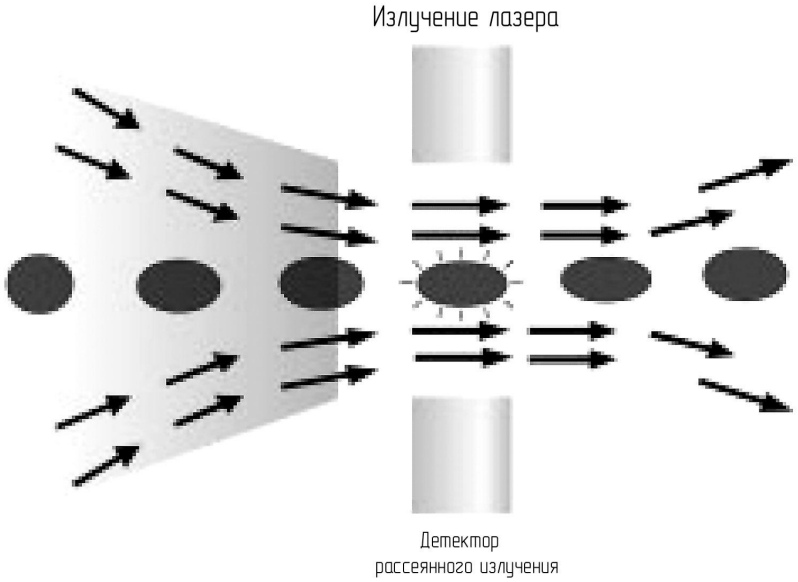
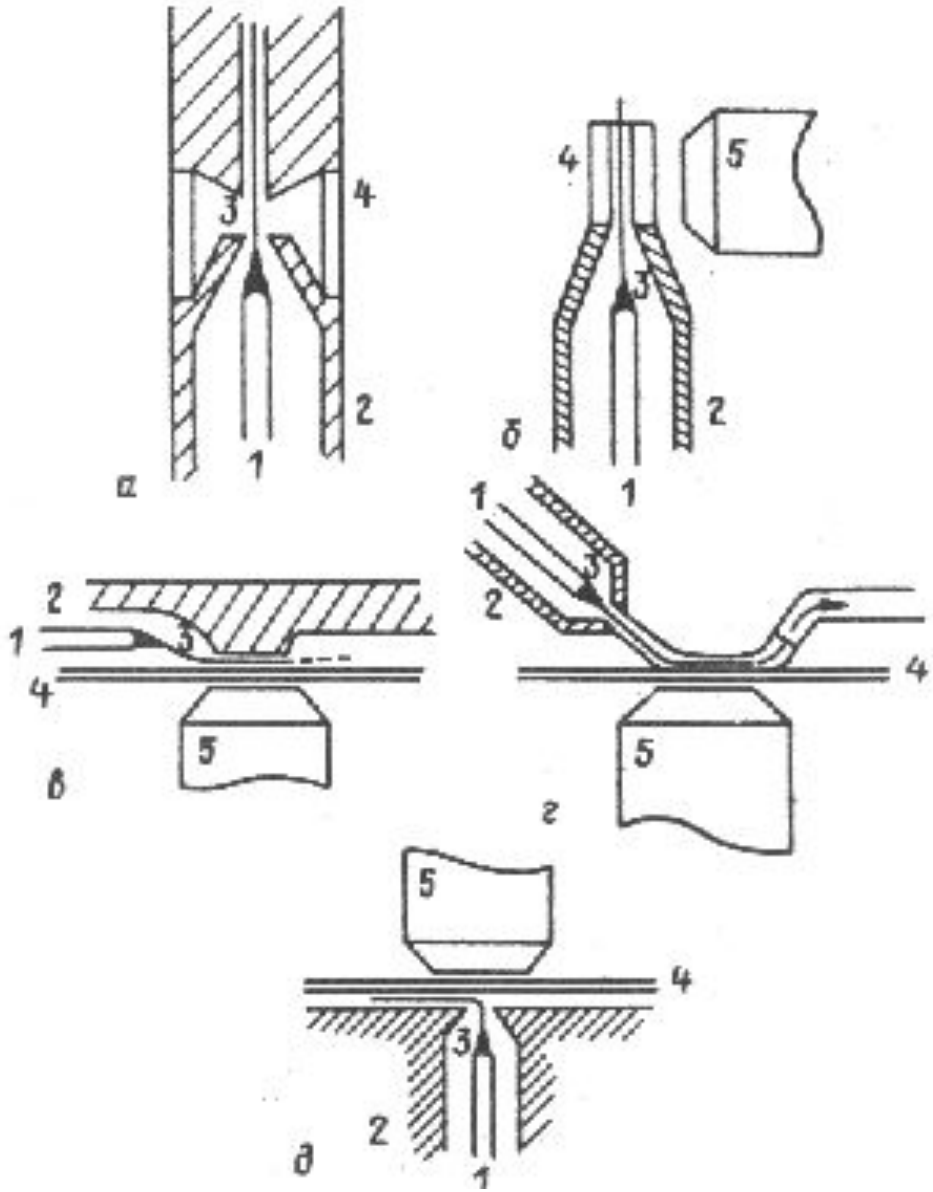


Схема устройства проточной ячейки



Изменение формы клеток при прохождении через апертуру счетчика

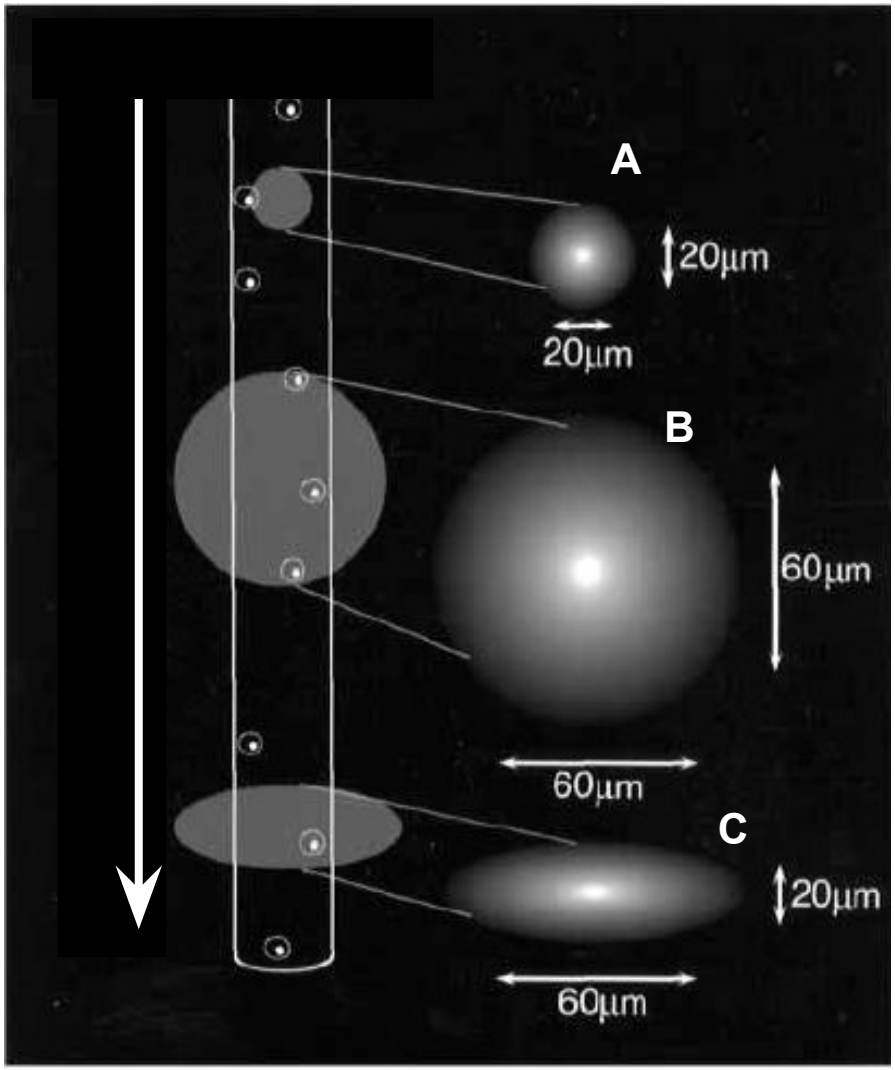




Конструкции проточных кювет анализаторов.

1 - сопло-инжектор
2 - коническая камера для фокусировки потока
3 - поток клеток
4 - оптическое окно
5 - объектив регистрирующей системы

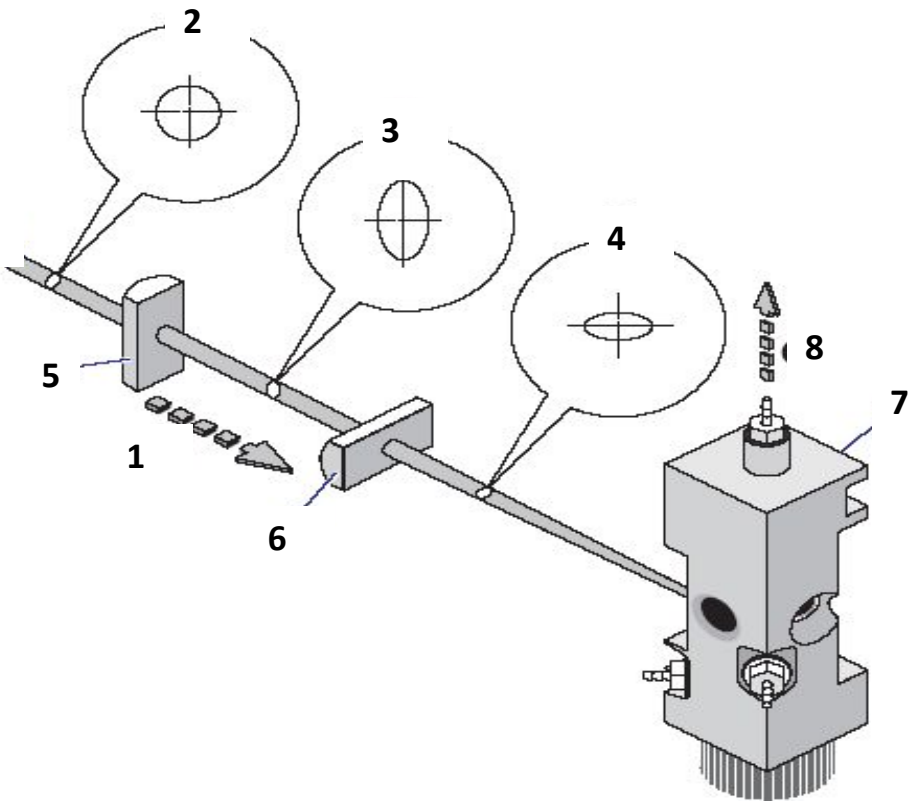
Освещение потока образца лучами различной формы



Интенсивность возбуждающего света должна быть по-возможности одинаковой по площади освещающего пятна (чтобы сигнал не зависел от траекторий отдельных частиц в потоке через зону детекции). А вдоль потока пятно луча должно быть узким (меньше диаметра анализируемых частиц), для лучщего пространственного разграничения частиц

Идеальная форма пятна – плоская полоса, перпендикулярная оси потока образца и превышающая поток по ширине.

Освещение кюветы

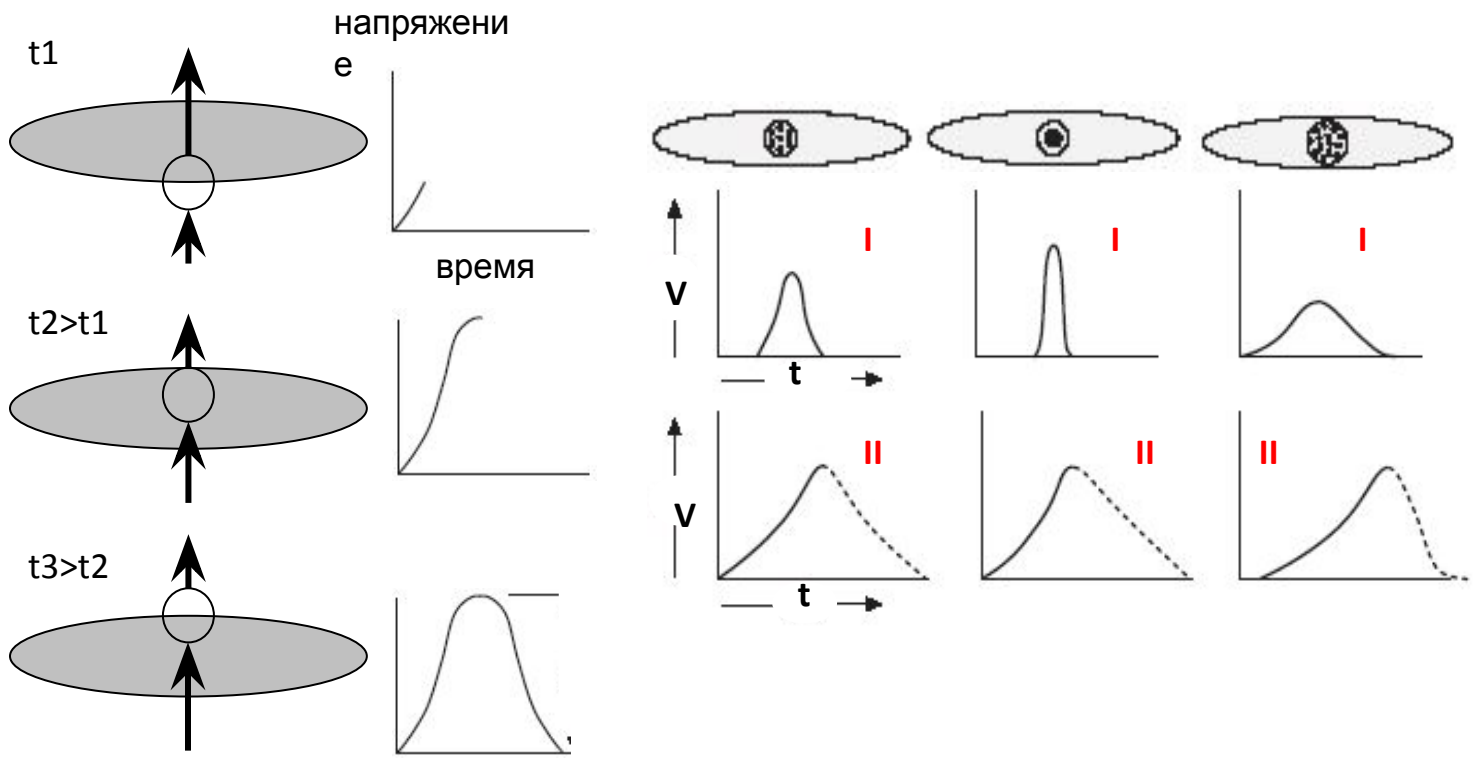


Эллиптическое пятно (**C**) обеспечивает наиболее однородное освещение частицы (в зависимости от траектории) и оптическое разделение частиц в потоке.

Элипсная форма светового пятна достигается при помощи пары скрещенных полуцилиндрических линз с большим фокусным расстоянием

Световой поток, попадающий на детектор, от клетки, преобразуется в импульс напряжения таким образом, что напряжение в каждый момент времени пропорционально интенсивности света. Форма первичного импульса напряжения отражает пространственное распределение сигнала по клетке

Для того, чтобы получить интенсивность флуоресценции суммарную от одной клетки, первичный импульс интегрируют



Зависимость формы первичного импульса (**I**) от распределения флуорофора по частице. Амплитуда интегрального сигнала (**II**) равна площади под первичным импульсом.

Оценка содержания гемоглобина

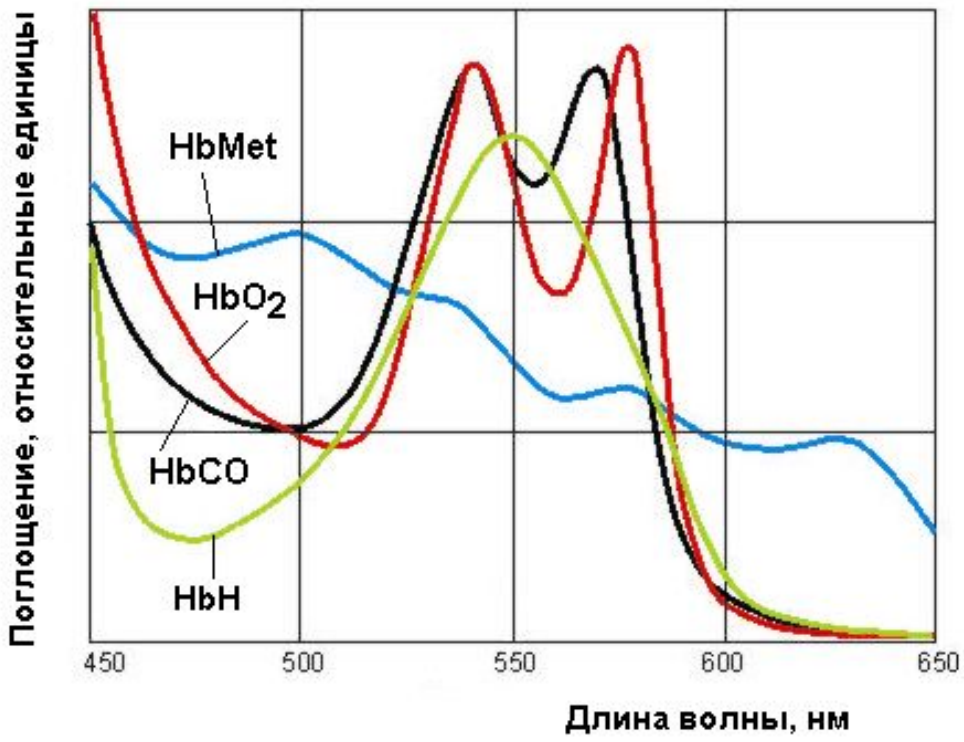
Клиническое значение

- *Снижение* концентрации гемоглобина: анемии.

Повышение концентрации гемоглобина: полицитемия, гемоконцентрация при дегитратации, ожогах, кишечной непроходимости, упорной рвоте; пребывание на больших высотах, чрезмерная физическая нагрузка или возбуждение; сердечно-сосудистая патология, обычно врожденная, приводящая к значительному венозному сбросу; заболевания легких, приводящие к снижению легочной перфузии, плохой аэрации легких, легочной артериальной фистуле; хроническое химическое воздействие нитритов, сульфонамидов, вызывающих образование мет- и сульфогемоглобина.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА

В крови гемоглобин существует по крайней мере в четырех формах: **оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, карбоксигемоглобин, метгемоглобин.**



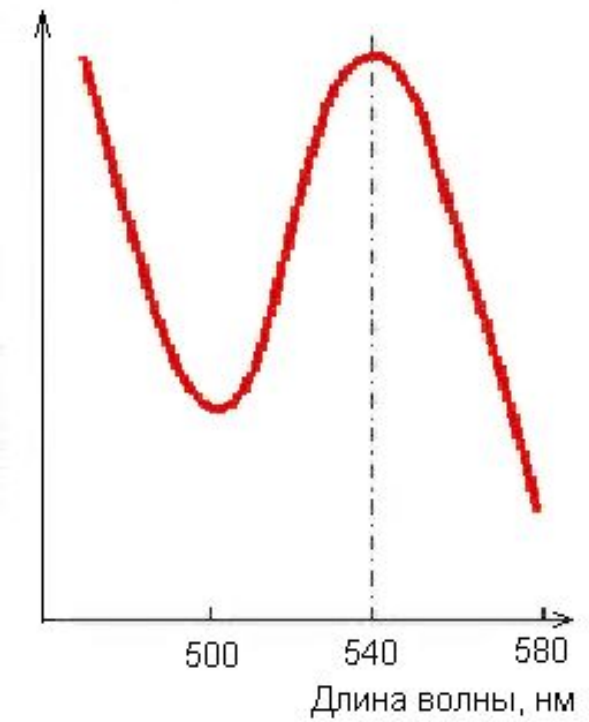
Спектры поглощения оксигемоглобина (HbO_2), дезоксигемоглобина (HbH) метгемоглобина (HbMet), карбоксигемоглобина (HbCO)

Для определения гемоглобина чаще всего анализируют производные гемоглобина, образовавшиеся в процессе его окисления и присоединения к гему различных химических групп, приводящих к изменению валентности железа и окраски раствора.

При количественном определении гемоглобина колориметрическими методами возникает **проблема в выборе реагента**, который **превращал бы все производные гемоглобина только в одну форму** перед фотометрическим анализом.

Лучшими методами, количественно превращающими гемоглобин в его производные, оказались
гемиглобинцианидный (HbCN),
гемихромный (HbChr)
и гемиглобиназидный (HbN3),
которые при фотометрировании дают наименьшую ошибку определения среди других методов анализа.

Гемиглобинцианидный метод (метод Драбкина) (1932)



Спектр поглощения цианметгемоглобина (CNmetHb)

- **<u>Принцип метода</u>:** все формы гемоглобина преобразуются в гемиглобинцианид (с помощью трансформирующего реагента, содержащего железосинеродистый калий, цианид калия и гидрокарбонат натрия), для которого установлен миллимолярный коэффициент экстинкции, равный 11,0 при длине волны 540 нм

$$Hb(г/л)= \frac{A_{540HiCN} \times 16114,5 \times 10^{-3} \times P}{11,0 \times L} = 367,7 \times A_{540HiCN}$$

$A_{540HiCN}$ - абсорбция раствора гемоглобина при длине волны 540 нм,
16114,5 - молекулярная масса мономера гемоглобина,
11,0 - коэффициент миллимолярной экстинкции цианметгемоглобина,
L - длина оптического пути, равная в большинстве фотометров 10 мм,
10^{-3} - перевод молярной массы гемоглобина в миллимолярную массу
P – разведение крови (1 : 251, соотношение 20 мкл крови и 5,0 мл трансформирующего раствора)

Перевод гемоглобина в гемиглобинцианид осуществляется при его взаимодействии с трансформирующим раствором, содержащим феррицианид калия, цианид калия, дигидрофосфат калия и неионный детергент. Дигидрофосфат калия поддерживает уровень pH, при котором реакция проходит за 3-5 минут. Детергент усиливает гемолиз эритроцитов и предотвращает мутность, связанную с белками плазмы. Феррицианид калия окисляет все формы гемоглобина в метгемоглобин, который образует с цианистым калием гемиглобинцианид, имеющий красноватый цвет, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации гемоглобина в пробе.

Характеристика метода

Гемиглобинцианидный метод, разработанный в 1936 г Драбкиным, был одобрен Международным Комитетом по стандартизации в гематологии (ICSH) в 1963 г.

Основные достоинства гемиглобинцианидного метода является то, что HbCN является стабильным производным гемоглобина, и все имеющиеся в крови формы гемоглобина могут быть быстро и количественно превращены в HbCN;

Метод обеспечивает возможность получения результатов с погрешностью, не превышающей ± 2%.

Требования безопасности при работе с раствором, содержащим цианистые соединения

При всех положительных параметрах гемиглобинцианидного метода большим его недостатком является то, что он основан на применении ядовитых цианистых соединений. Вместо цианистого калия многие применяют маскированный цианид - ацетонциангидрин, который в процессе приготовления трансформирующего раствора распадается с образованием цианид-иона. Характер действия ацетонциангидрина на человека сходен с действием синильной кислоты, но эффект развивается медленнее. Ацетонциангидрин всасывается через кожу и может вызывать тяжелые отравления. Его предельно-допустимая концентрация (ПДК) составляет 0,9 мг/м3, класс опасности 2.

К недостатку метода можно отнести и длительное время реакции – около 20 минут.

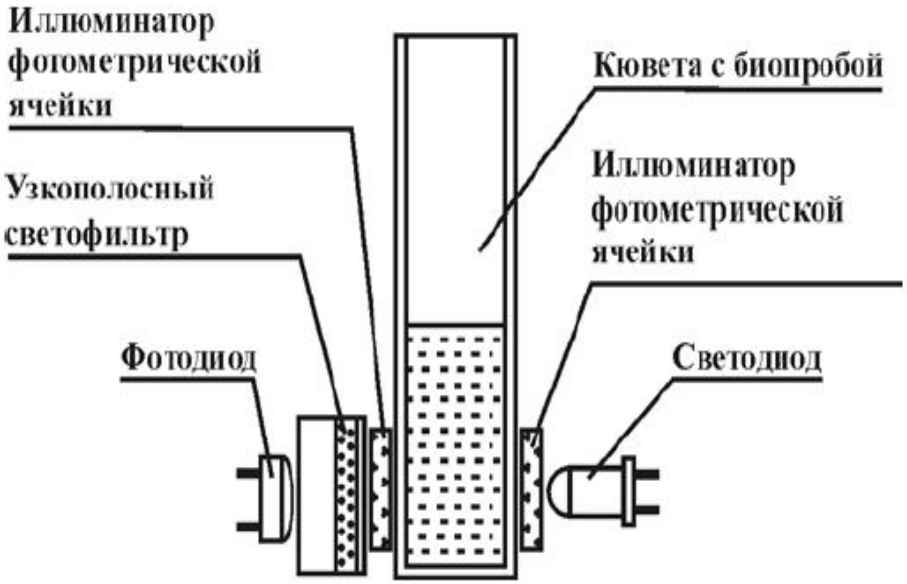
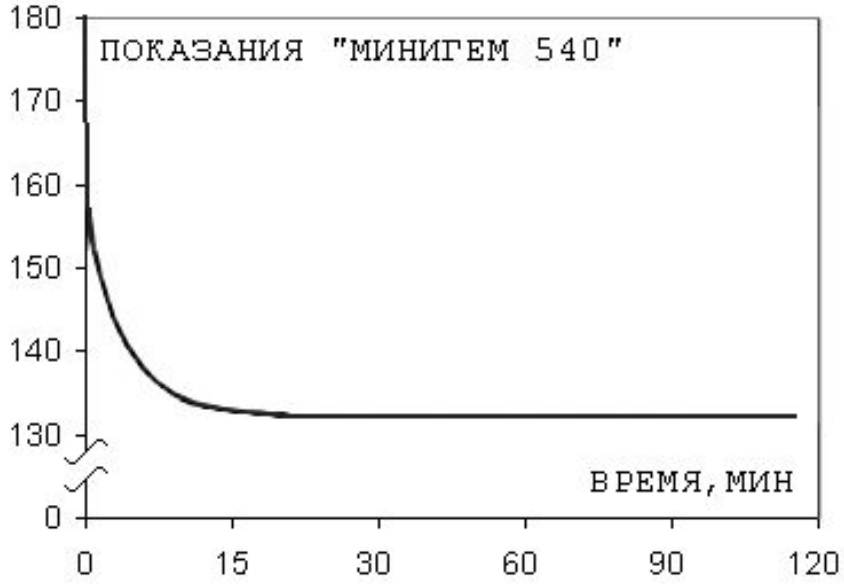


Рис. 122. **Гемоглобинометр МиниГЕМ** - оптическая схема и внешний вид.

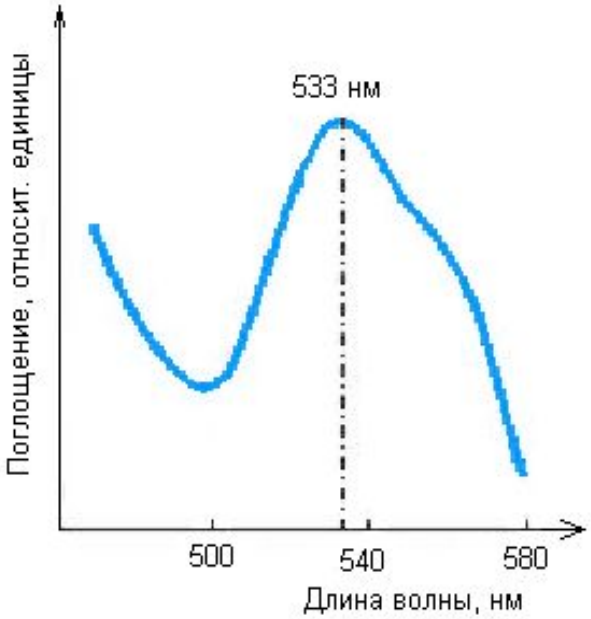
Зависимость показаний гемоглобинометра “**МиниГем-540**” от времени инкубации образцов крови с трансформирующим раствором



Из графика видно, что лишь на 15 минуте от начала реакции лизиса показания прибора начинают стабилизироваться и далее уже не меняются в течение последующих 2 часов. Поэтому, измерение гемоглобина следует проводить не ранее, чем через 20 минут после внесения крови в пробирку с трансформирующим раствором, когда весь имеющийся в пробирке гемоглобин преобразуется в конечный продукт реакции - цианметгемоглобин.

Гемихромный метод

Принцип гемихромного метода основан на переводе всех форм гемоглобина в одну - гемихром. При взаимодействии гемоглобина с трансформирующим раствором, содержащим жирные кислоты с феррицианидом калия или додецилсульфат натрия, происходит его превращение в окисленную низкоспиновую форму - гемихром (HbChr), имеющую красноватый цвет, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации гемоглобина в пробе.



Спектр поглощения метгемоглобина (HbMet)

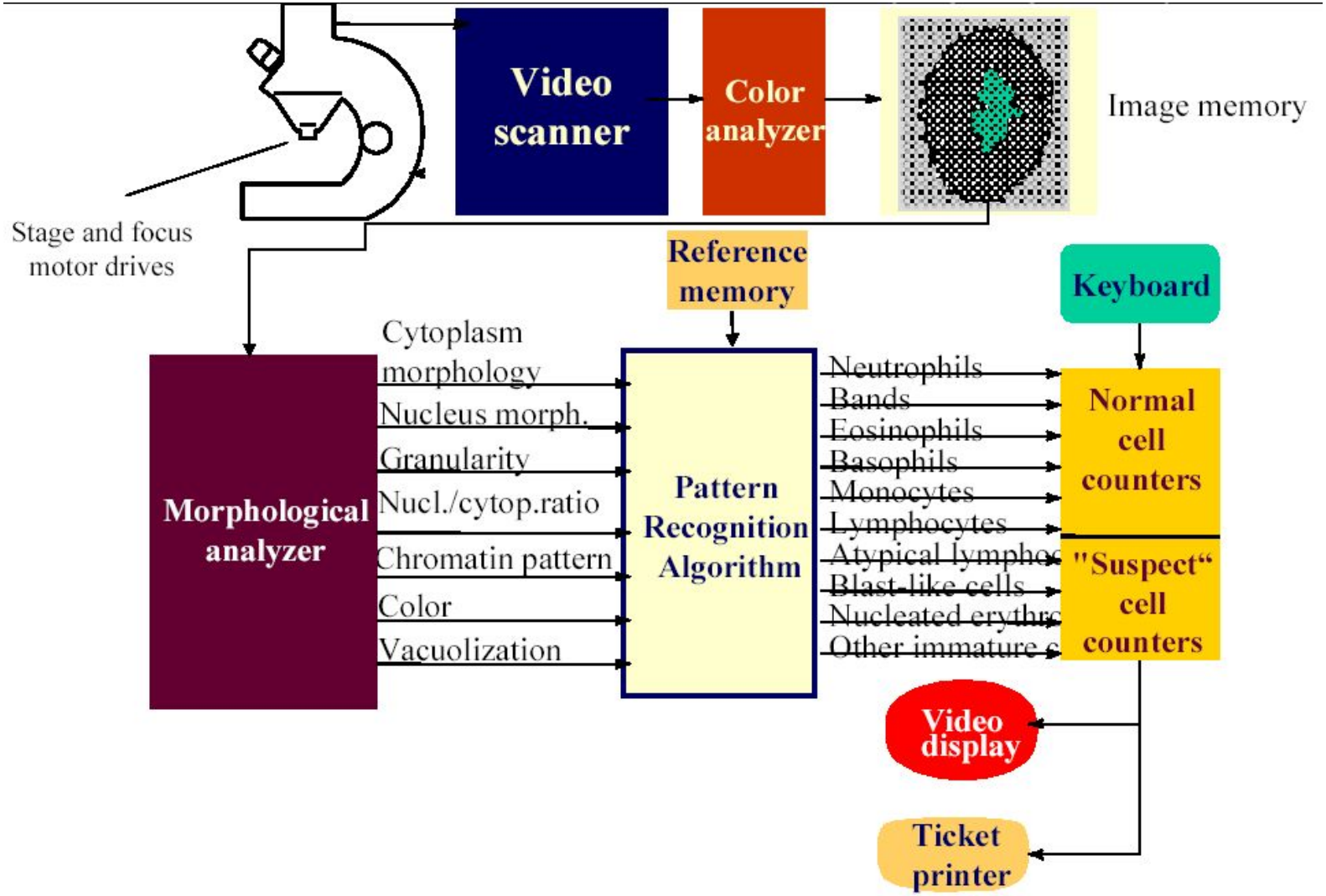
Максимум кривой поглощения гемихрома находится на длине волны 533 нм.

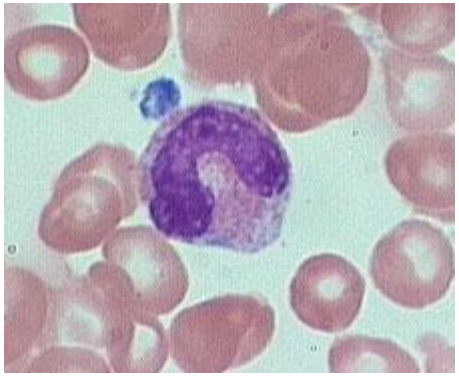
Ближайшая к 533 нм типовая длина волны – 540 нм, на которой и проводится фотометрирование с учетом коэффициента пересчета (фактора) для 540 нм.

Основным достоинством **гемихромного** метода является то, что содержащиеся в крови формы гемоглобина могут быть быстро и количественно превращены в HbChr при полной безвредности трансформирующего раствора;

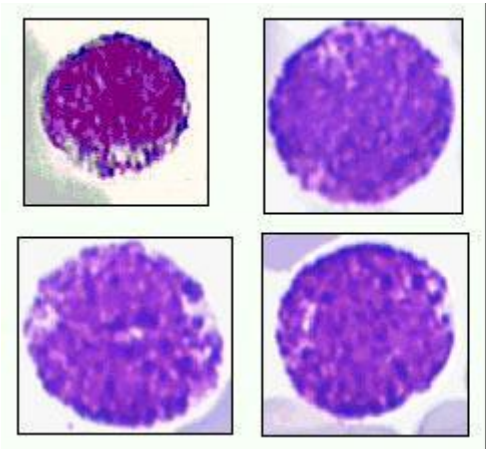
Сканирующая микроскопия

Автоматизация рутинных исследований в гематологии

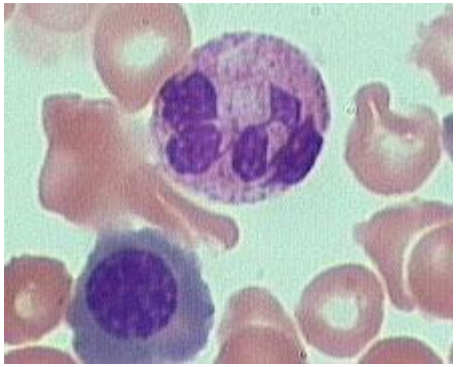

Video scanner
Color analyzer
Image memory
Stage and focus motor drives
Reference memory
Keyboard
Cytoplasm morphology
Nucleus morph.
Granularity
Nucl./cytop.ratio
Chromatin pattern
Color
Vacuolization
Morphological analyzer
Pattern Recognition Algorithm
Neutrophils
Bands
Eosinophils
Basophils
Monocytes
Lymphocytes
Atypical lymphoc
Blast-like cells
Nucleated erythro
Other immature c
Normal cell counters
"Suspect" cell counters
Video display
Ticket printer



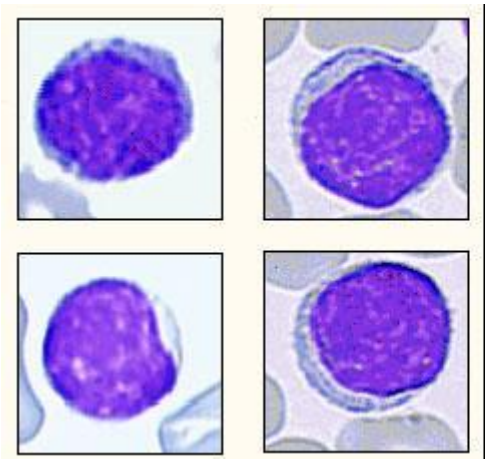
палочкоядерный нейтрофил



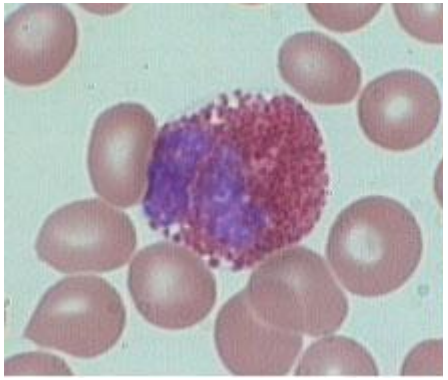
базоофилы



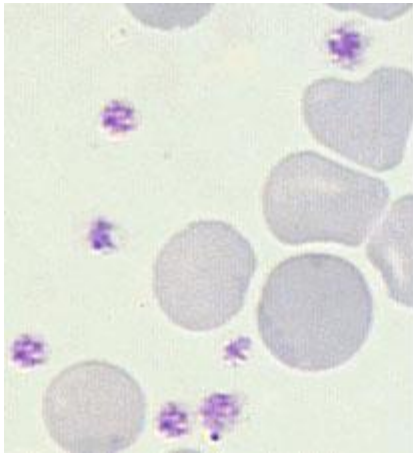
сегментоядерный нейтрофил



лимфоциты

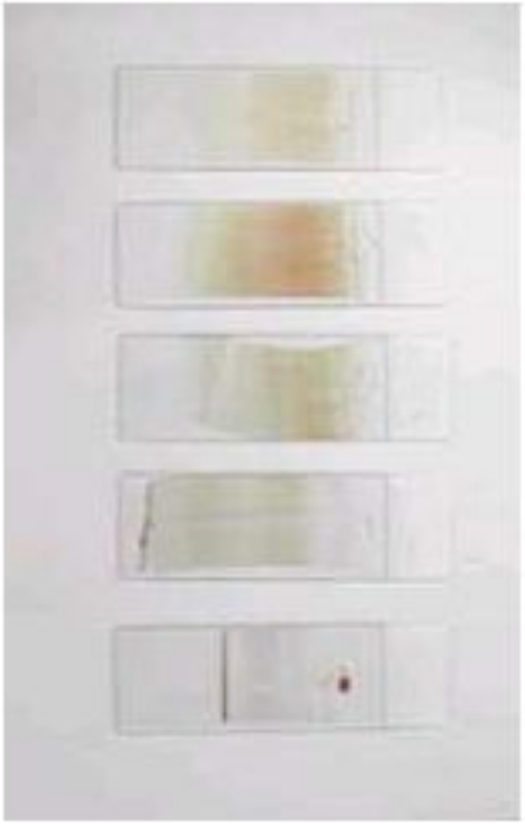


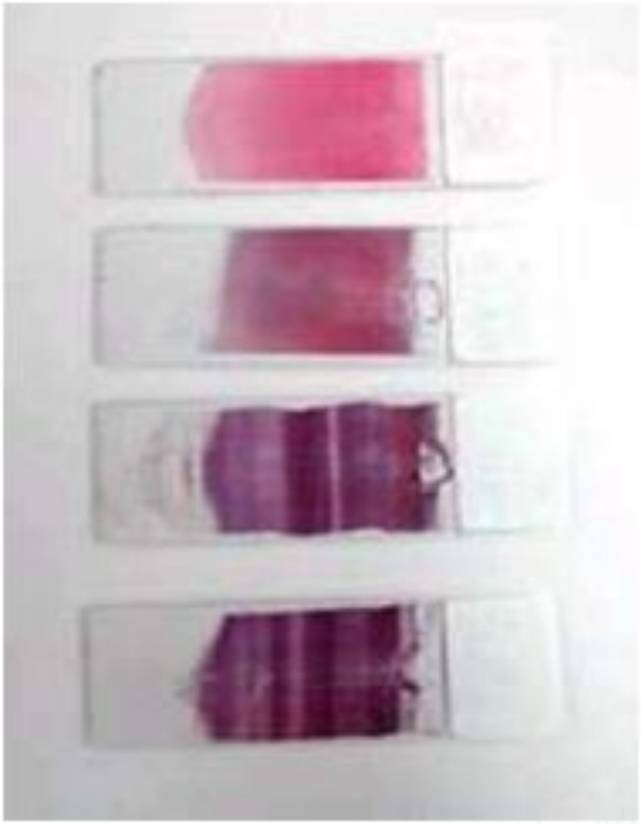
эозинофилы



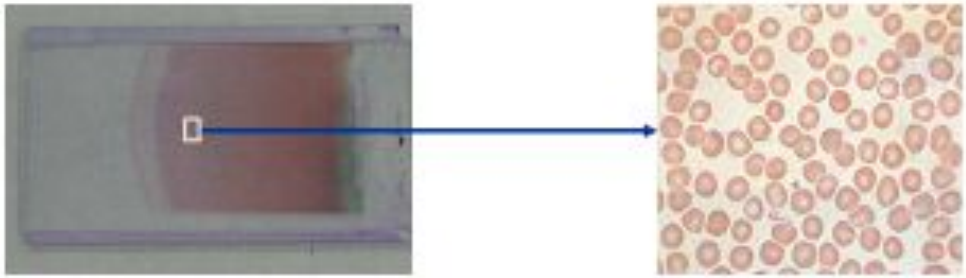
томбоциты

Качество мазков, приготовленных ручным методом





Мазок приготовленный на SP-1000i



Автоматизация рутинных исследований в гематологии
Станция приготовления и окраски мазков SP-1000i

Современные тенденции в гематологии

- Современные информационные технологии позволяют хранить графические данные
- Фотографии клеток крови сохраняются для:
  - Пересмотра
  - Приложений телегематологии (E-mail, Server)
  - Документации в истории болезни пациента
  - Образовательных целей
- Уменьшение количества ручной микроскопии
- Решение: Автоматизированная цифровая микроскопия

Почему автоматизированная цифровая микроскопия?

- Стандартизация и автоматизация дифференцировки клеток
- В комбинации с автоматизацией подготовки и окраски мазка цифровая микроскопия улучшает качество дифференцировки
- Подсчет на большое число клеток (определяется пользователем)
- Неограниченное время хранения графических результатов дифференцировки
- Оптимально для подсчета образцов с цитопенией
- Оптимизация рабочих потоков в лаборатории
- Наличие телегематологических приложений

Сравнение проточного и микроскопического методов цитоанализа

Тип анализатора	Проточный	Микроскоп+врач или автоматическая система микроскопии
Объем выборки анализируемых объектов	+ Большой (100 000 и более)	- Небольшой (обычно до 1000; макс. 100 000)
Скорость измерений	+ высокая (100 000/мин)	- низкая (обычно до 500/мин; макс. 5000/мин)
Состав измеряемых признаков	- простой (простая морфология, метки)	+ сложный (сложная морфология)
Необходимый объем биоматериала для анализа	- Большой (обычно больше 1 мл, больше 100 000 объектов)	+ Небольшой, могут быть единицы объектов
Возможность обнаружения объектов с низкой концентрацией	- Отсутствует при концентрациях меньше 1/10 000	+ Возможно обнаружение единичных объектов
Разнообразие агрегатных состояний биоматериала	- только суспензия	+ Большое
Наличие визуального контроля	- Нет	+ Есть
Основное диагностическое применение	+ Обнаружение патологии	+ Дифференциальная диагностика

Ошибки преаналитического периода

- Подготовка больного к исследованию ***(прием пищи, физическая и эмоциональная нагрузка, положение тела, циркадные ритмы и т.д.)***
- Сбор и хранение материала ***(применение антикоагулянтов, соблюдение анаэробности, обеспечение свободного тока, соблюдение условий забора и хранения материала и т.д.)***
- **Доставка материала в лабораторию, обработка его до начала анализа *(гемолиз, задержка отделения плазмы, длительная транспортировка и т.д.)***
- **Канцелярские ошибки *(ошибочный больной, образец, заявка, маркировка)***

Ошибки связанные с доставкой и хранением

- Автоматизированное исследование крови необходимо проводить либо непосредственно после взятия (исключается возможность спонтанной агрегации тромбоцитов), либо спустя 25 мин (время, необходимое для адаптации тромбоцитов к антикоагулянту) и не позднее 6 -8 часов после взятия образца.
- Кровь нельзя замораживать. Образцы крови должны храниться при комнатной температуре.
- Капиллярную кровь с ЭДТА следует хранить при комнатной температуре и анализировать в течение 4 часов после взятия.
- При необходимости проведения отсроченного анализа (транспортировка на отдаленные расстояния, техническая неполадка прибора и т. д.), пробы крови хранят в холодильнике (4° – 8° C) и исследуют в течение 24 часов.
- Исследование крови на приборе проводится при комнатной температуре. Кровь, хранившуюся в холодильнике, необходимо вначале согреть до комнатной температуры,
- Приготовление мазков крови рекомендуется делать не позднее 1-2 часов после взятия крови.

Ошибки аналитического периода

- Ошибки дозирования проб (пипетирования)
- Дефекты измерительных приборов, калибровок, плохое качество реактивов
- Использование устаревших методик
- Низкая квалификация и недобросовестность персонала

Оптические измерительные приборы

- Фотометры и спектрофотометры
- Денситометры
- Флюориметры и спектрофлюориметры
- Пламенные фотометры
- Люминометры
- Нефелометры

Применение оптических методов

- количественный анализ однокомпонентных и многокомпонентных смесей,
- качественный анализ, т.е. идентификацию веществ,
- исследование биохимических процессов,
- анализ белков и определение их концентрации,
- анализ нуклеиновых кислот,
- анализ фракций при разделении и очистке веществ,
- определения концентрации микроорганизмов,
- исследование внутренней структуры клеток,
- исследование структуры белков.
- определение концентрации различных антигенов в пробах и при анализе ДНК и мембранных маркеров клеток.

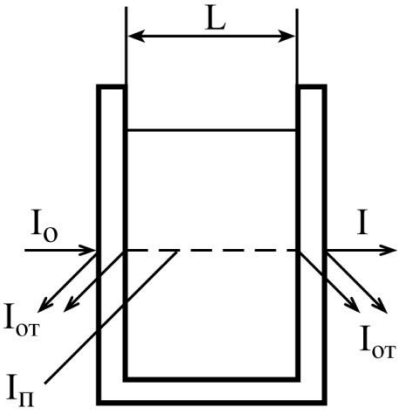
Классификация оптических методов исследования

- *Классификация по спектральным характеристикам оптического излучения*:
- а) Фотометрические
- б) Спектрофотометрические

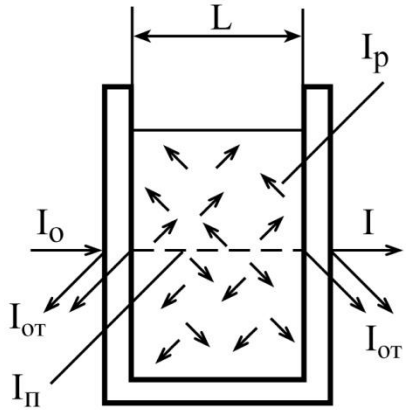
- 2. *Классификация по виду взаимодействия вещества с излучением*:
- а) Абсорбционная фотометрия
- б) Нефелометрия
- в) Турбидиметрия
- г) Рефлектометрия
- д) Эмиссионная фотометрия (пламенная)
- е) Люминисцентная фотометрия

- 3. *Классификация методов по объектам исследования*:
- а) Методы исследования биопробы и жидкости (аналитические)
- б) Методы, предназначенные для исследования организма.

Явления, возникающие при прохождении света через объекты



прозрачный раствор



дисперсная среда

$I_0 = I_{от} + I_п + I$ – для раствора,

$I_0 = I_{от} + I_п + I_р + I$ – для дисперсной среды

I_0 – интенсивность падающего светового потока;

$I_{от}$ – интенсивность светового потока, отраженной от стенки кюветы;

Iп – интенсивность светового потока, поглощенной окрашенным раствором;

$I_р$ – интенсивность светового потока, рассеянного дисперсной средой;

I – интенсивность светового потока, прошедшего через слой исследуемого вещества.

Классификация оптических методов исследования

Классификация по спектральным характеристикам оптического излучения:

а) Фотометрические

б) Спектрофотометрические

2. *Классификация по виду взаимодействия вещества с излучением*:

а) Абсорбционная фотометрия

б) Нефелометрия

в) Турбидиметрия

г) Рефлектометрия

д) Эмиссионная фотометрия

е) Люминисцентная фотометрия

3. *Классификация методов по объектам исследования*:

а) Методы исследования биопробы и жидкости (аналитические)

б) Методы, предназначенные для исследования организма.

Адсорбционная фотометрия

Принцип метода

- Фотометрические методы исследования базируются на способности жидких сред (растворов) поглощать световое излучение.
- В основу абсорбционного метода анализа положен обобщенный *закон Бугера–Ламберта–Бера*.

Используемые физические законы

- **Закон Бугера — Ламберта — Бера** — определят ослабление параллельного монохроматического пучка света при проходе через поглощающую среду .

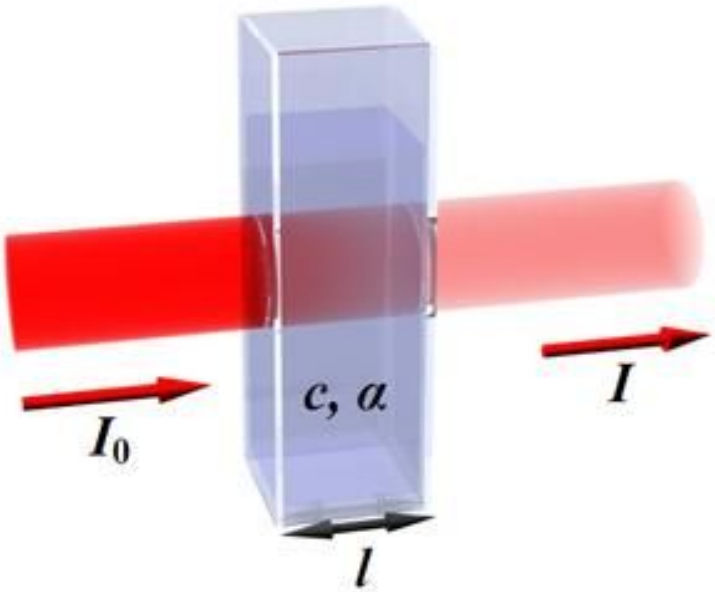
$$I(l) = I_0 e^{-k_\lambda l}$$

I — интенсивность после прохода через среду

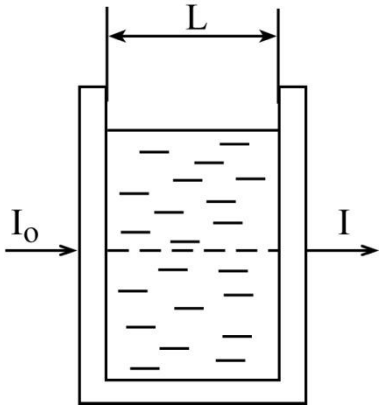
I_0 — интенсивность входящего пучка света

k_λ — показатель поглощения (коэффициент поглощения)

l — толщина слоя вещества, через которое проходит свет



Прохождение светового потока через кювету с раствором



$T = I / I_0$ – коэффициент пропускания

$D = \lg(1/T) = \lg(I_o/I)$ – оптическая плотность

К примеру

D=4 означает, что свет был ослаблен в 10^4=10 000 раз, то есть для человека это полностью чёрный объект, а

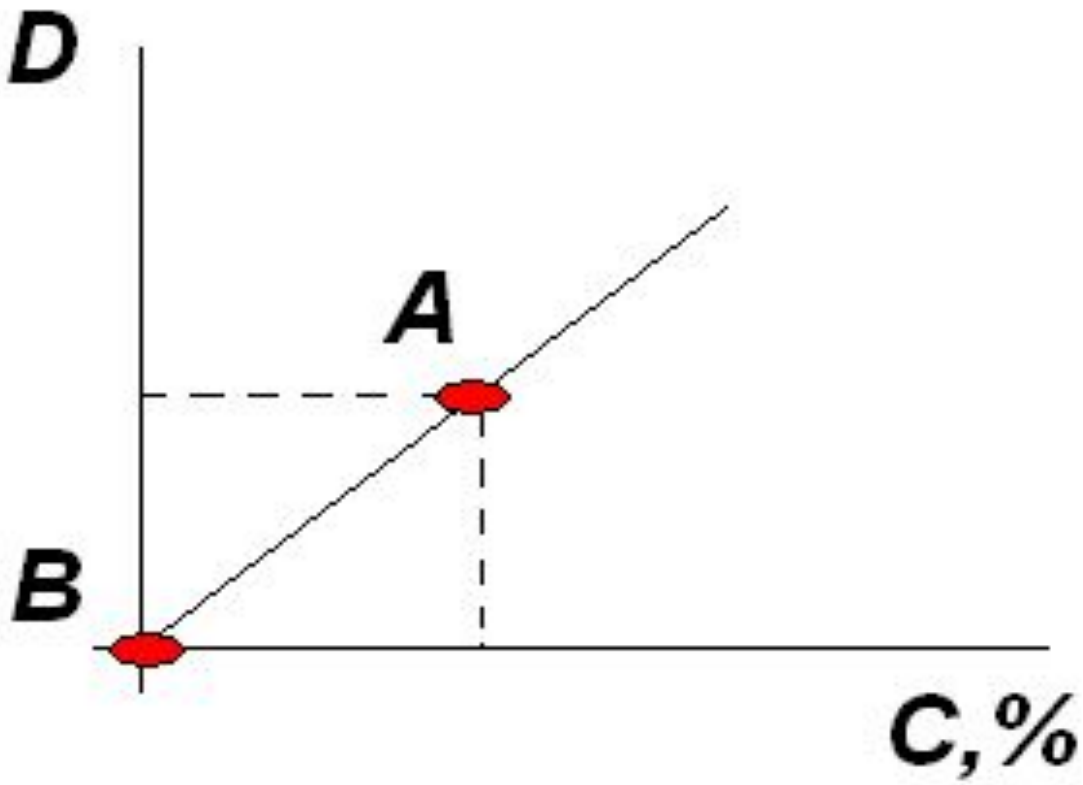
D=0 означает, что свет прошёл (отразился) полностью.

При наличии в растворе нескольких поглощающих компонентов:

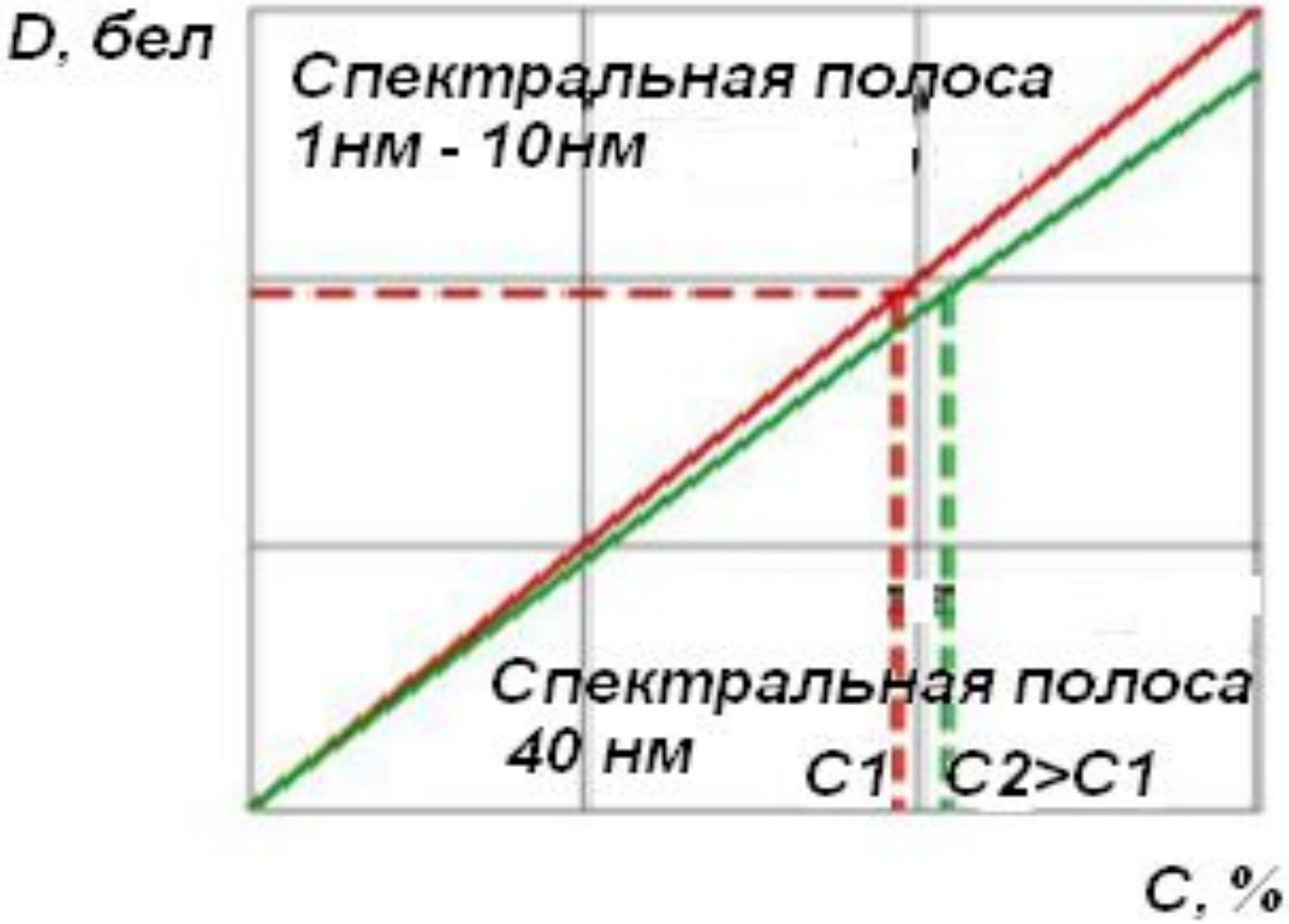
$$\lg (I_0/I) = \sum_{i=1}^{n} \lg (I_0/I_i) = \sum_{i=1}^{n} D_{\lambda i}$$

– Нахождение оптической плотности р-ра для нескольких веществ

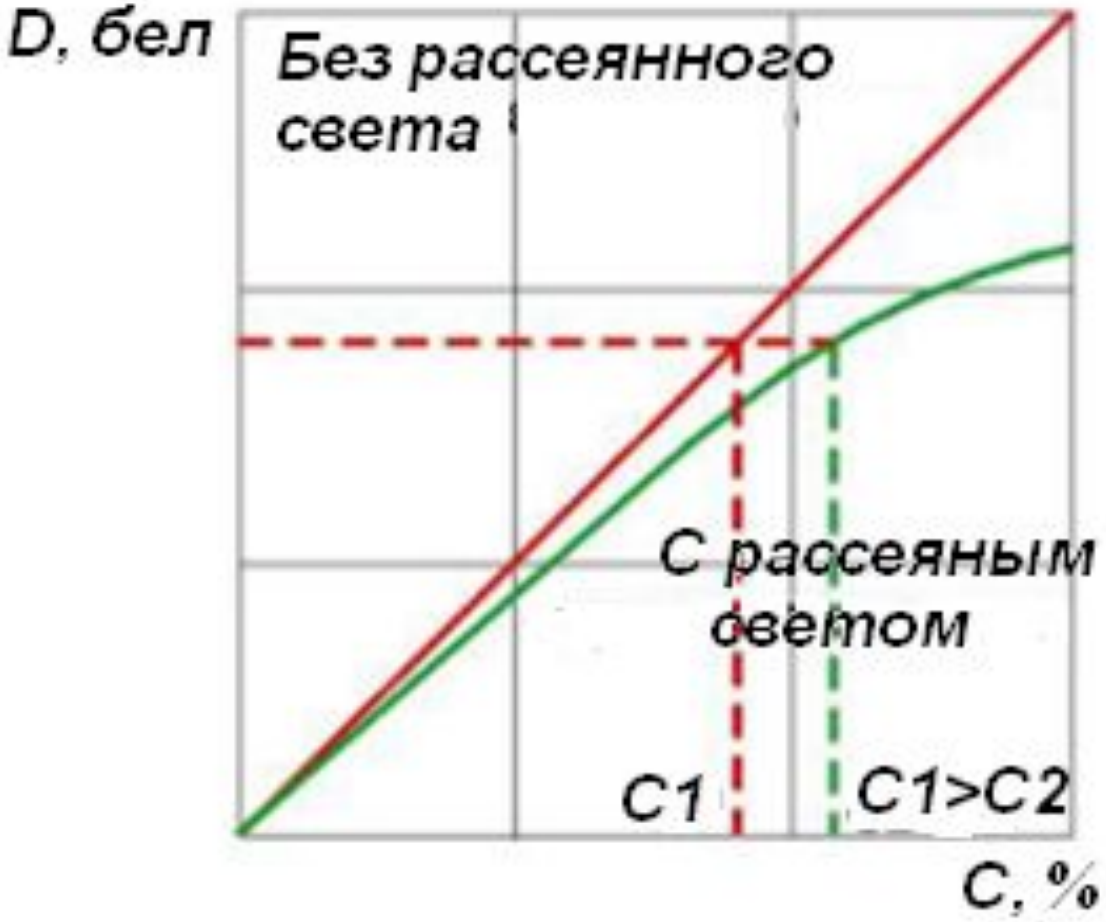
График зависимости оптической плотности от концентрации



Зависимость оптической плотности от концентрации вещества в растворе при различной спектральной полосе пропускания светофильтра



Влияние рассеянного и постороннего концентрации света на результат измерения



Биохимические методики (тесты) для микрофотометров МИКРОЛА

340 нм. Кинетика - АСТ, АЛТ, КК-МВ, КФК, ЛДГ, мочевина; Конечная точка - иммуноглобулины IGA, IGM, IG, мочевина, фосфор, С реактивный белок, неорганические фосфаты, глюкоза в крови и моче.
405 нм. Кинетика - А-Амилаза, ГГТ, ЩФ, КФ, активность антитромбина III, активность плазминогена, активность протеина С, анти Ха активность гепарина; Конечная точка - креатинин, натрий, гликогемоглобин HbA1, активность антитромбина III, активность плазминогена, активность протеина С, анти Ха активность гепарина.
492 нм. Кинетика – креатинин; Конечная точка - хлориды.
523 нм. Конечная точка – гемоглобин (1), глюкоза, триглициридыы, холестерин, билирубин общий, мочевая кислота.
540 нм. Конечная точка - гемоглобин (4), глюкоза, триглициридыы, холестерин, холестерин- ЛВП, белок общий, альбумин, билирубин общий, билирубин прямой+общий, лактат, мочевая кислота, магний .
580 нм. Конечная точка - липаза, калий, кальций, железо, хлориды. 600 нм. Конечная точка - общий белок в ликворе и в моче ПГК, общий белок в моче Бредфорд, общий белок в моче ССК.
620 нм. Конечная точка – железо, альбумин, HDL-холестерин, LDL-холестерин, кальций, ревматоидный фактор.

Оптическая схема

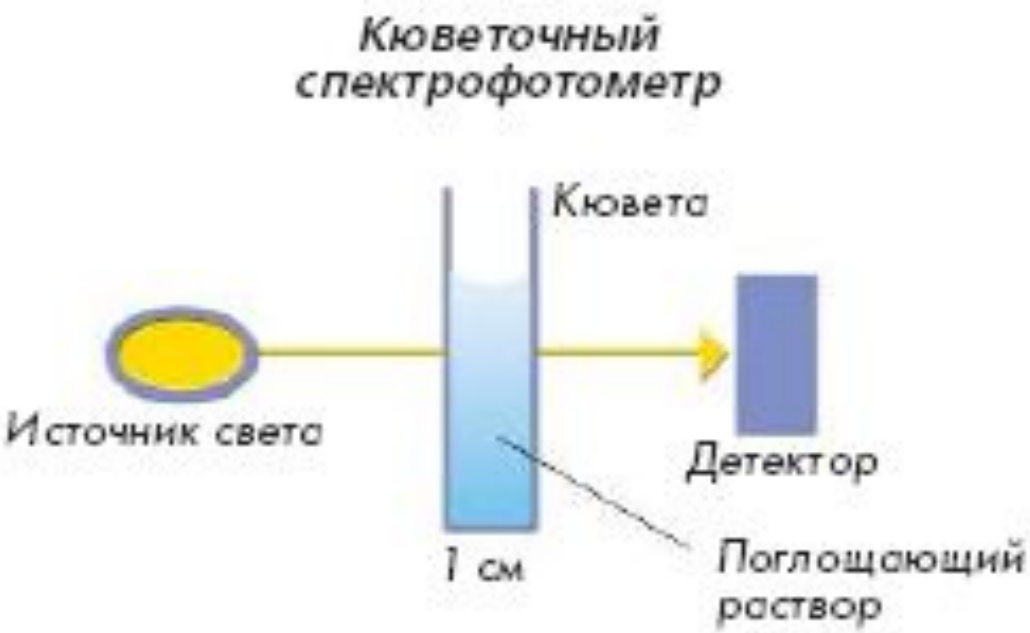
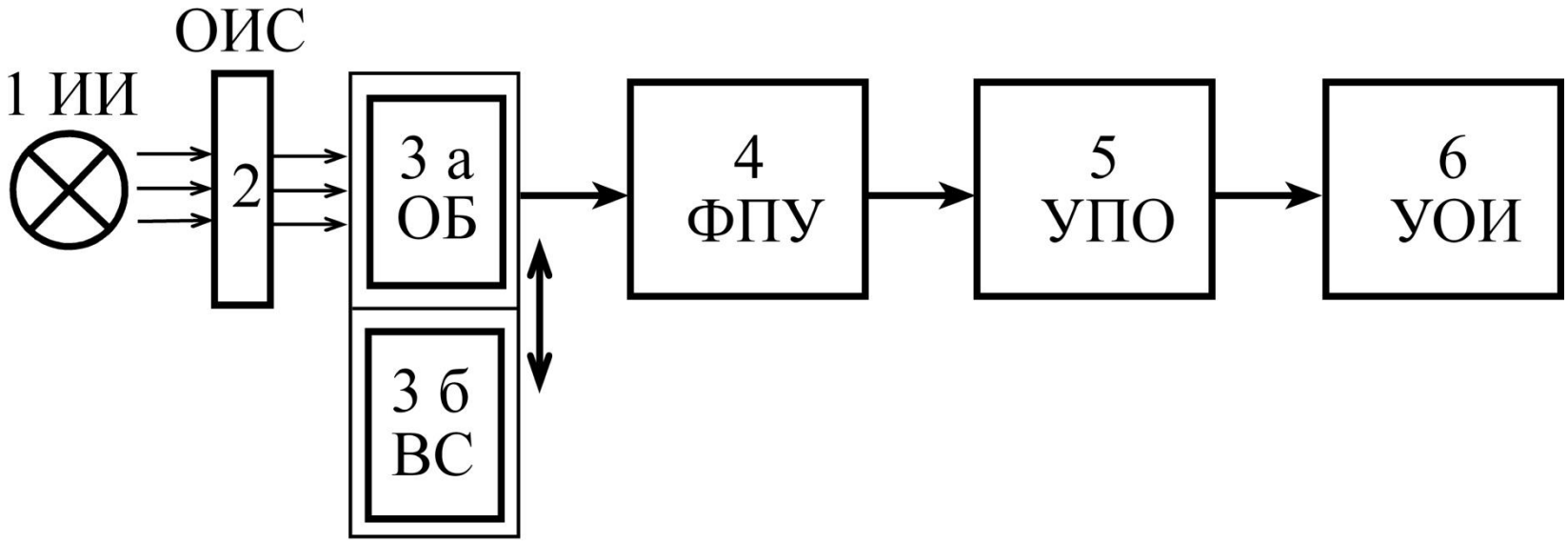


Схема одноканального абсорбционного фотоколориметра



- 1 – источник излучения 2 – оптическая избирательная система, 3а – исследуемое вещество, 3б – вещество сравнения, 4 – фотоприемное устройство, 5 – устройство преобразования информации, 6 – устройство регистрации и отображения информации.

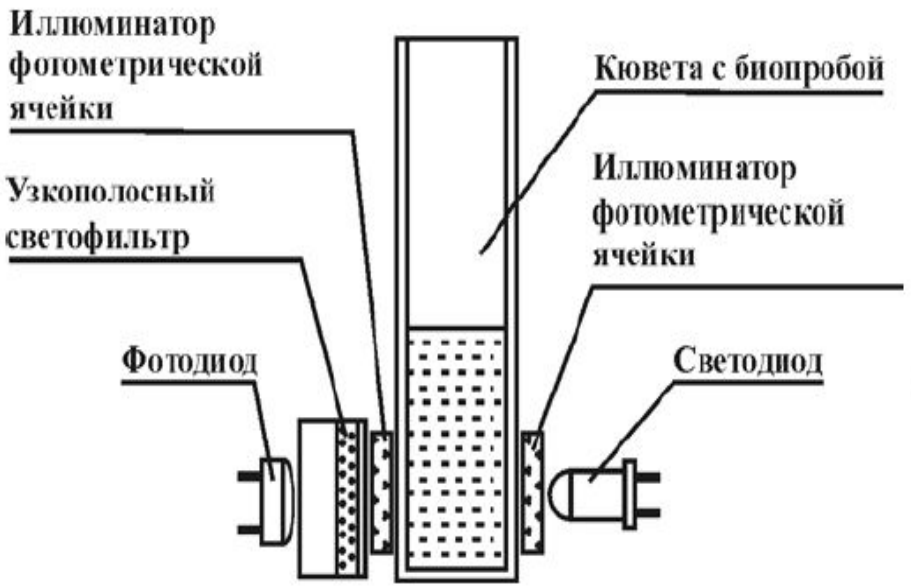


Рис. 122. **Гемоглобинометр МиниГЕМ** - оптическая схема и внешний вид.

Структура двулучевого одноволнового фотометра

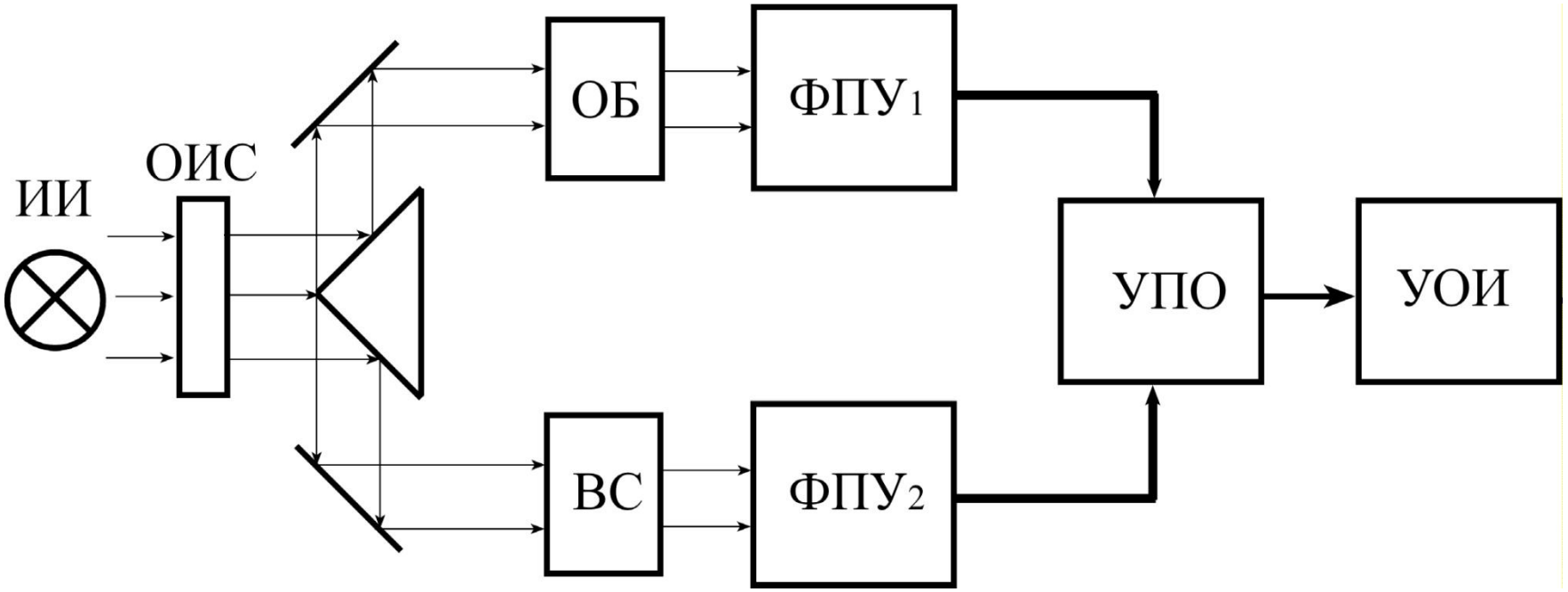
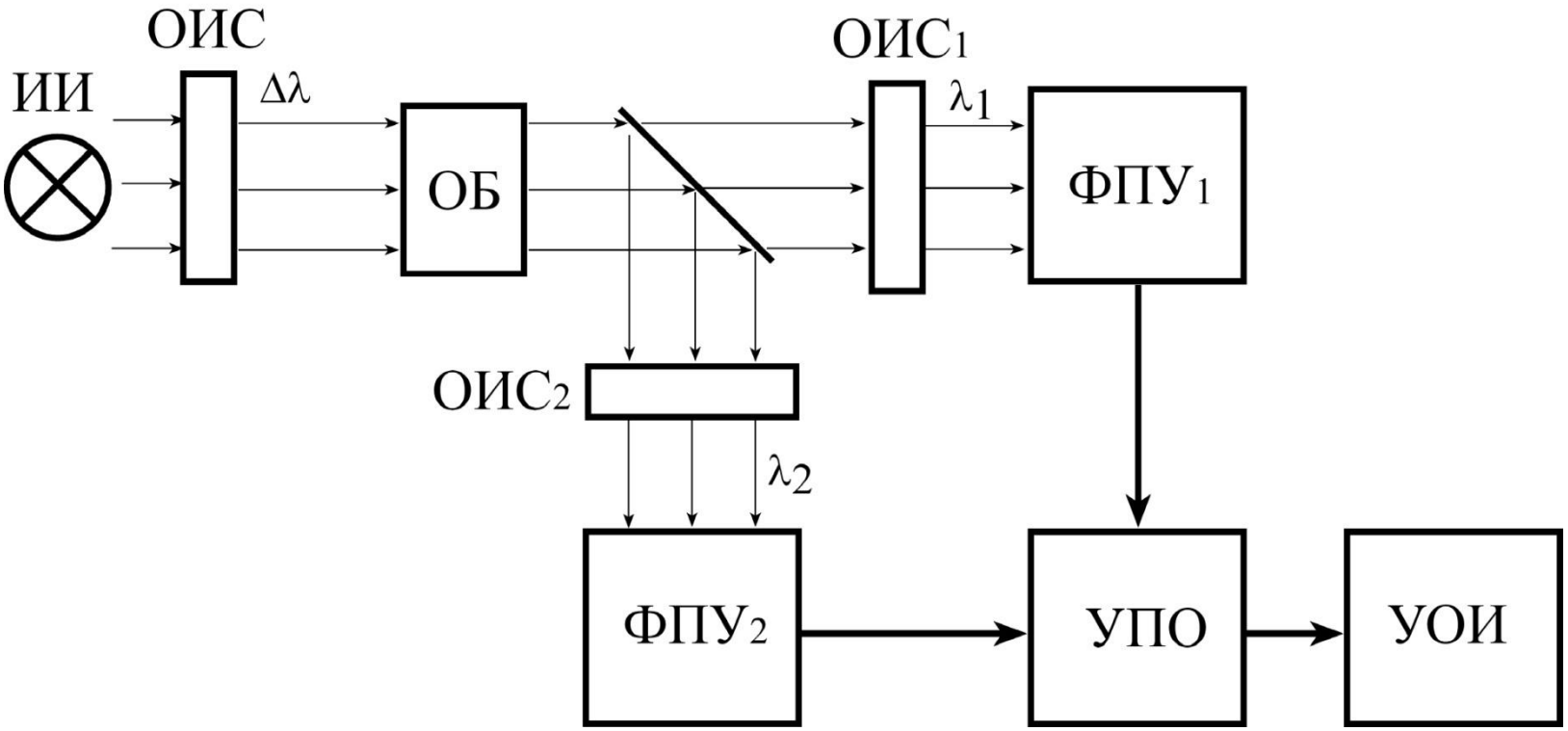
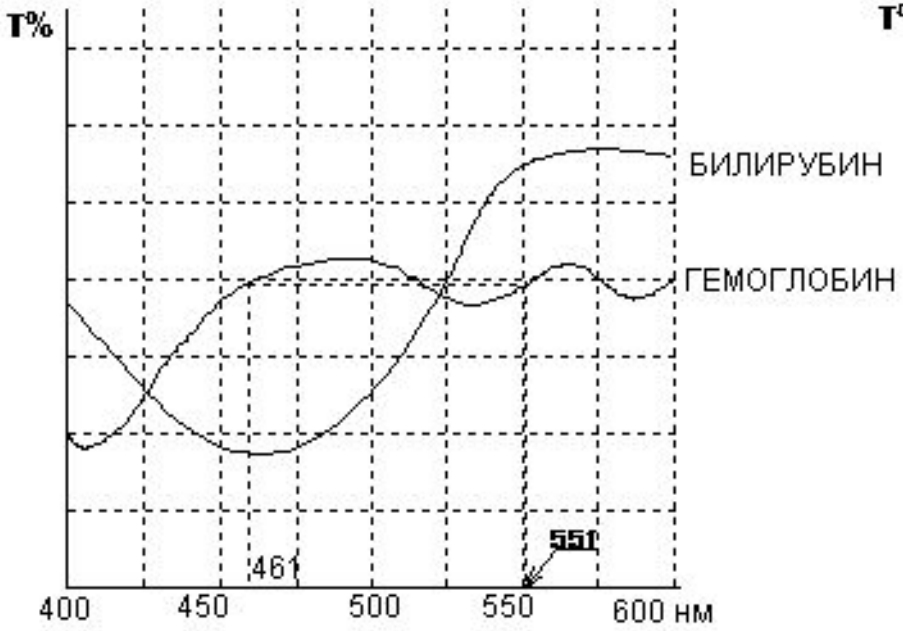
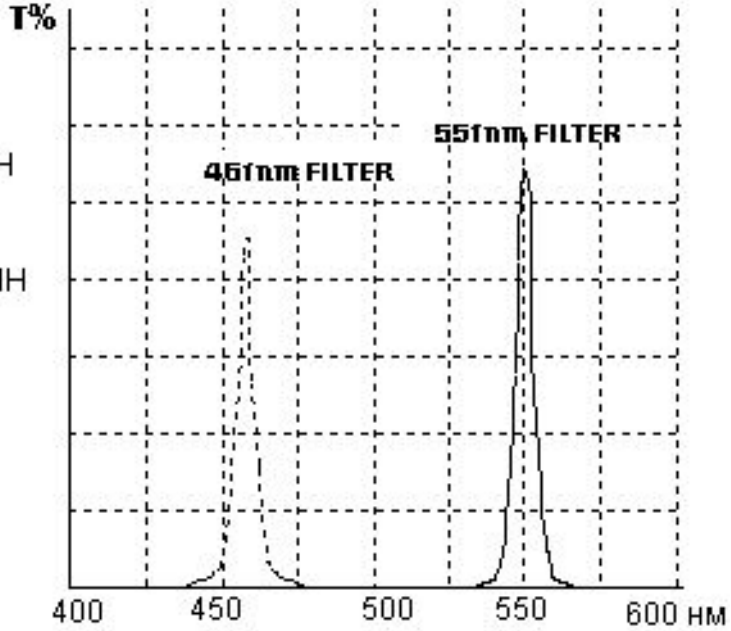


Схема двухволнового одноканального фотометра



Билирубинометры





Билирубинометры разработаны для прямого измерения общего билирубина.

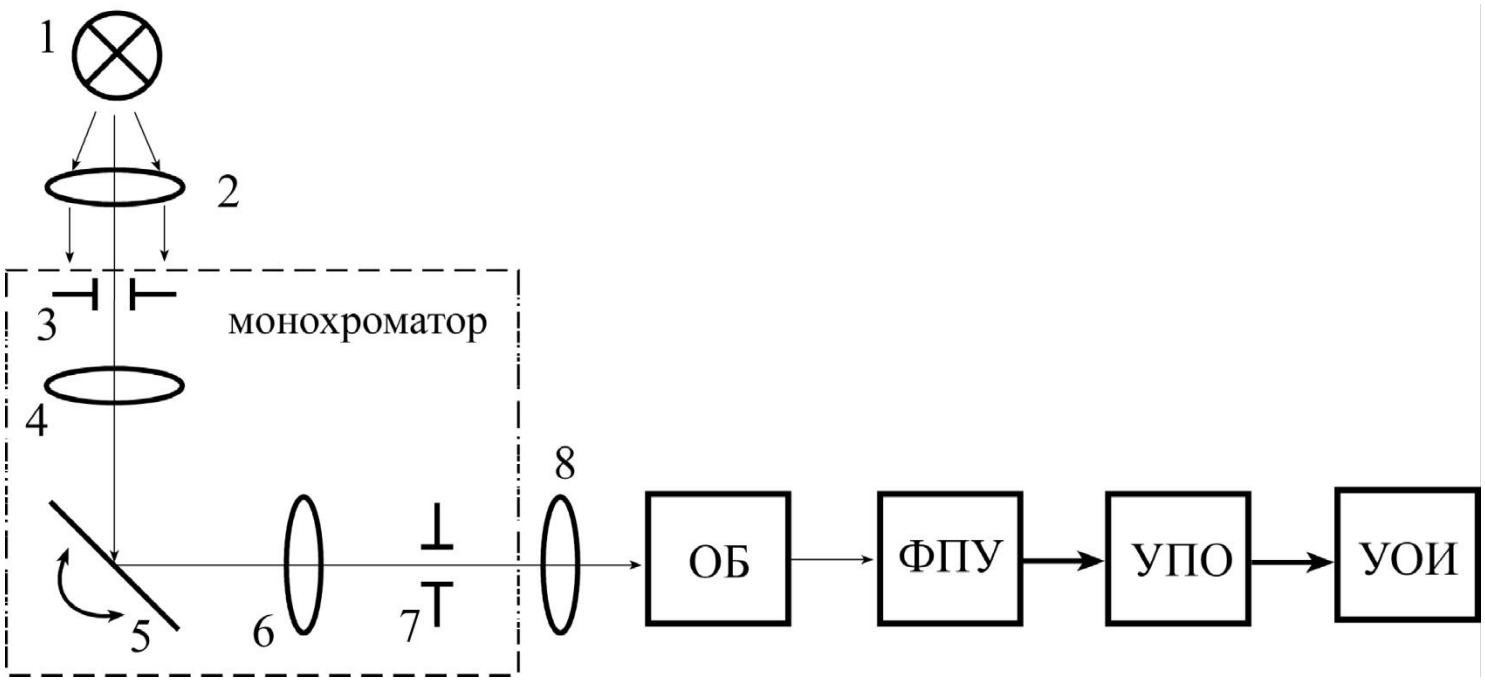
Измерение происходит в гематокритном капилляре с помощью двух длин волн 461 нм и 551 нм. Максимум поглощения (минимум светопропускания) для билирубина в сыворотке наблюдается при 461 нм (как показано на графиках). Но в тестируемой жидкости также находятся и другие агенты, например, гемоглобин вследствие гемолиза, поэтому, для большей точности в данном приборе используется второй фильтр – 551 нм. Конечный результат получается в виде разницы оптических плотностей, полученных на двух фильтрах.

Преимущества метода: очень широкий диапазон измерения общего билирубина: 0–513 мкмоль/л, минимальная погрешность (5%), малый объем пробы крови (2 капли), быстрое измерение, нет необходимости в реактивах.

Спектрофотометры

- Основное отличие спектрофотометра от электрофотоколориметра состоит в возможности пропустить через исследуемую пробу световой поток любой нужной длины волны, проводить фотометрические измерения, сканируя весь диапазон длин волн не только видимого (VIS) света от 380 до 750 нм, но и ближнего ультрафиолета (UV) от 190 до 380 нм.

Обобщенная структурная схема одноканального спектрофотометра



1 – источник световой энергии, 2 – оптическая система, направляющая поток энергии на входную щель; 3 – входная щель; 4 – оптическая система, формирующая параллельный поток световой энергии; 5 – диспергирующий элемент (призма или дифракционная решетка); 6 – оптическая система, направляющая поток энергии на выходную щель; 7 – выходная щель; 8 – оптическая система, формирующая поток энергии, проходящий через кювету.

Основные характеристики спектральных приборов

1. Разрешающая способность СП
2. Линейная дисперсия
3. Обратная линейная дисперсия
4. Светосила
5. Аппаратная функция
6. Разрешение СП
7. Предел разрешения
8. Спектральный диапазон
9. Оптический диапазон
10. Скорость регистрации спектра

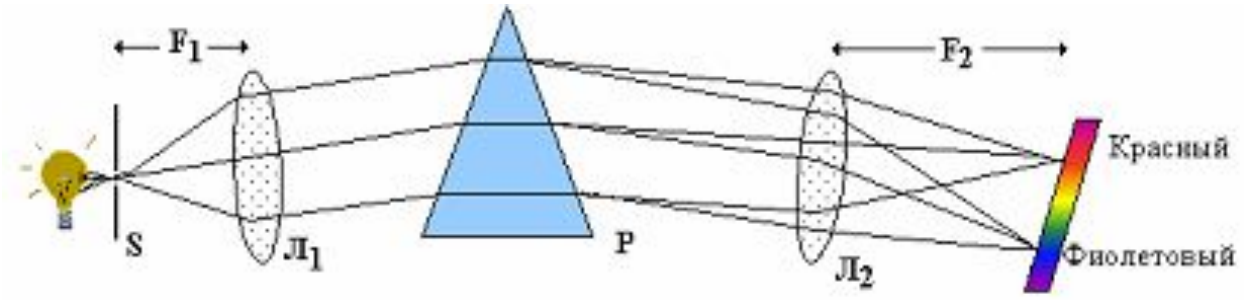
Классификация спектральных приборов

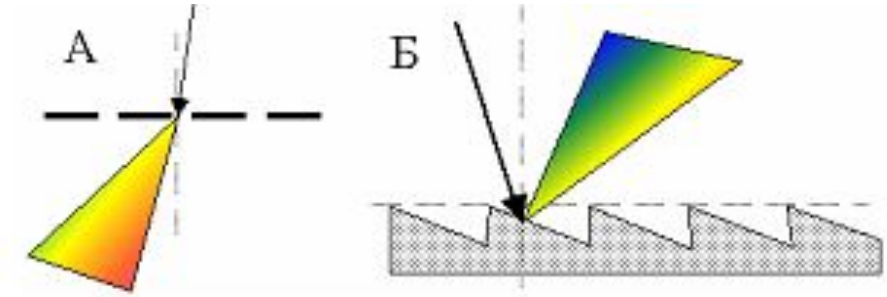
по способу диспергирования света

- **призменные** – характеризуются зависимостью линейной дисперсии от длины волны, узким спектральным диапазоном, малой разрешающей способностью;
- **дифракционные** – характеризуются большим спектральным диапазоном, большим разрешением, малой зависимостью дисперсии от длины волны, большой светосилой; недостатком является перекрывание спектров различных порядков;
- **интерференционные** – основаны на принципе интерференции параллельных пучков света; характеризуются наиболее высоким разрешением, светосилой и др. параметрами; наиболее перспективные;
- **недисперсионные** – не производится разложение излучения в спектр с помощью диспергирующего элемента, а используются либо монохроматические источники (лазер с перестраиваемой частотой) либо набор сменных светофильтров.

Монохроматоры

- Призмы (220 – 950 нм)
- Дифракционные решетки (200 – 800 нм)





Классификация спектральных приборов

по методу регистрации

- визуальное наблюдение спектров – спектроскоп, используется для экспресс анализа биопроб;
- фотографическая регистрация спектра – спектрограф, используется на металлургических предприятиях, с помощью фотопластинки проводят количественный анализ;
- фотоэлектрическая регистрация:

а) **монохроматор** – в выходной плоскости спектра находится выходная щель, за которой расположен фото- или тепловой приемник излучения;

б) **полихроматор** (квантометр) – в плоскости спектра имеется несколько выходных щелей (2-20) за каждой из которых расположен приемник излучения.

1

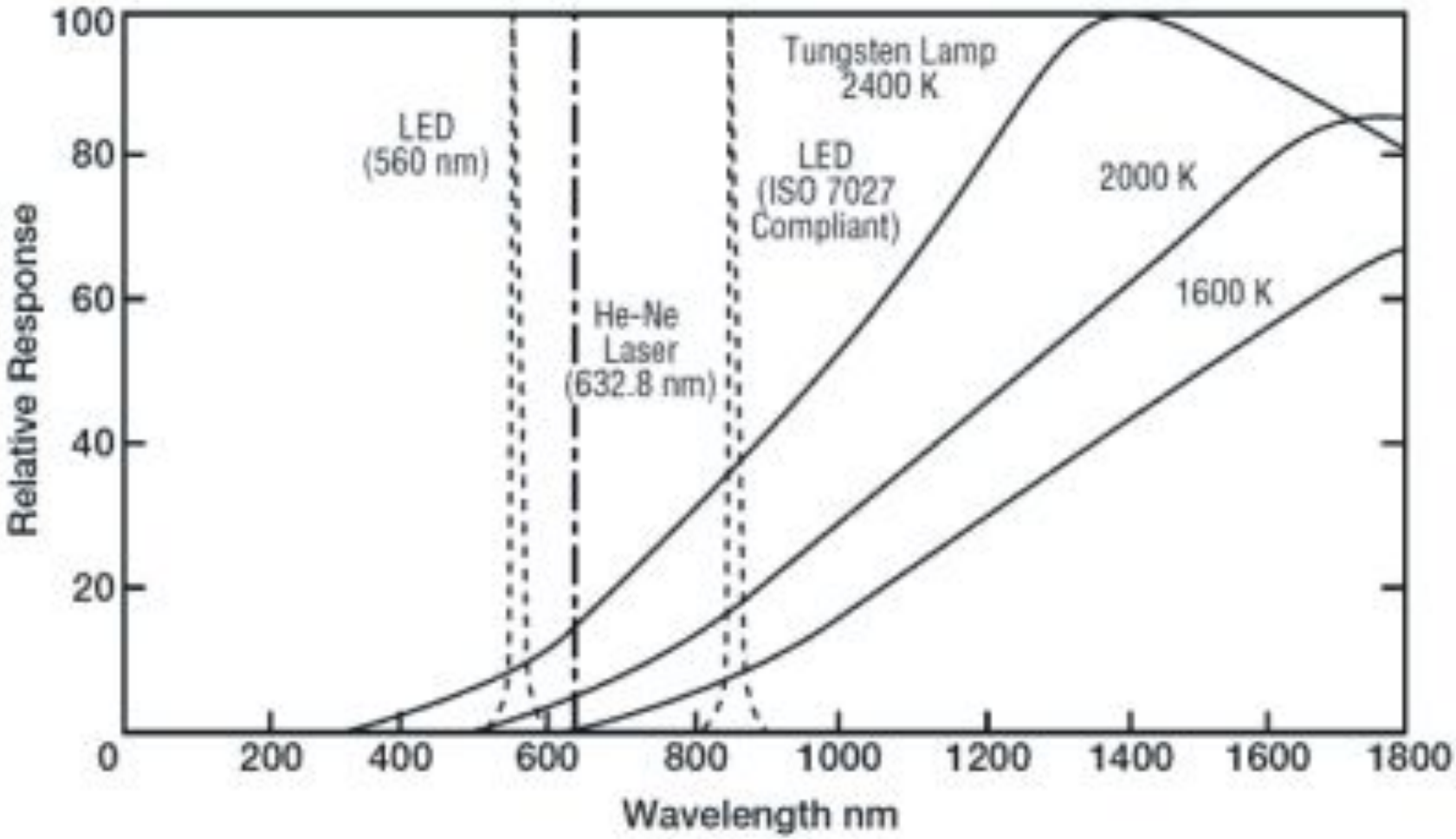
2

Рис. 115. **Микроспектрофотометр** фирмы MicroPart на основе микроэлектронного чипа с фотодиодной линейкой.
1 – общий вид; 2 – конструкция чипа: Б – белый свет, С- синий участок спектра, К- красный участок спектра

Источники излучения

- Водородные или дейтериевые газоразрядные лампы (200 - 360 нм)
- Галогеновые лампы (200 - 360 нм)
- Лампы накаливания с вольфрамовой нитью (360 – 800 нм)

Типичные спектральные характеристики лампы накаливания при трех цветовых температурах, светодиода 560 нм, He-Ne лазера и диода 860 нм,



Классификация спектральных приборов

по виду спектрального анализа:

нефелометр - регистрация спектров рассеяния, как правило, в нефелометрах используют или лазерное излучение, или регистрируют рассеяние интегрально в широком диапазоне частот (галогеновая лампа);

метод турбидиметрии (специального названия приборов нет, т.к. этот метод используется дополнительно во многих фотометрах): регистрация спектров пропускания;

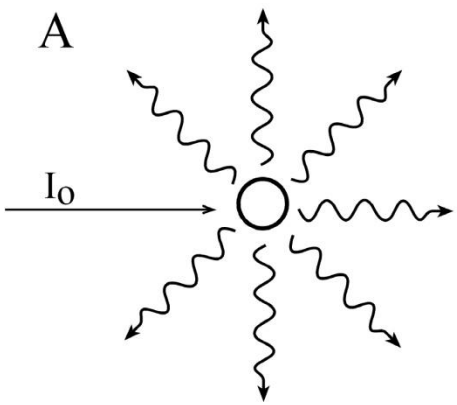
пламенный и газоразрядный спектрофотометр - спектр испускания, возбуждение производится нагревом или газовым разрядом, может использоваться как диспергирующий элемент, так и фильтр;

Спектрофлуориметр - спектр фотолюминесценции, диспергирующий элемент или фильтр; часто эти приборы могут регистрировать КР-спектры.

Нефелометрия и турбидиметрия

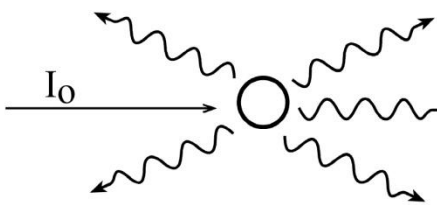
Рассеяние света при различных соотношениях размера частиц ***a*** и длины волны электромагнитного излучения ***λ***

Рэлеевское рассеяние

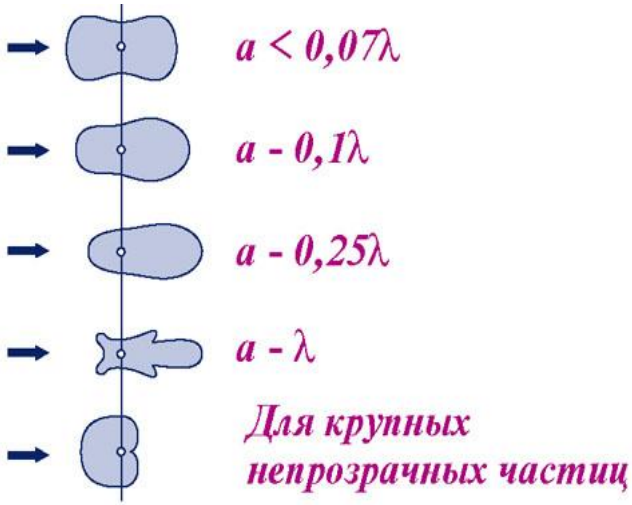


a<0.12 λ

Рассеяние Ми

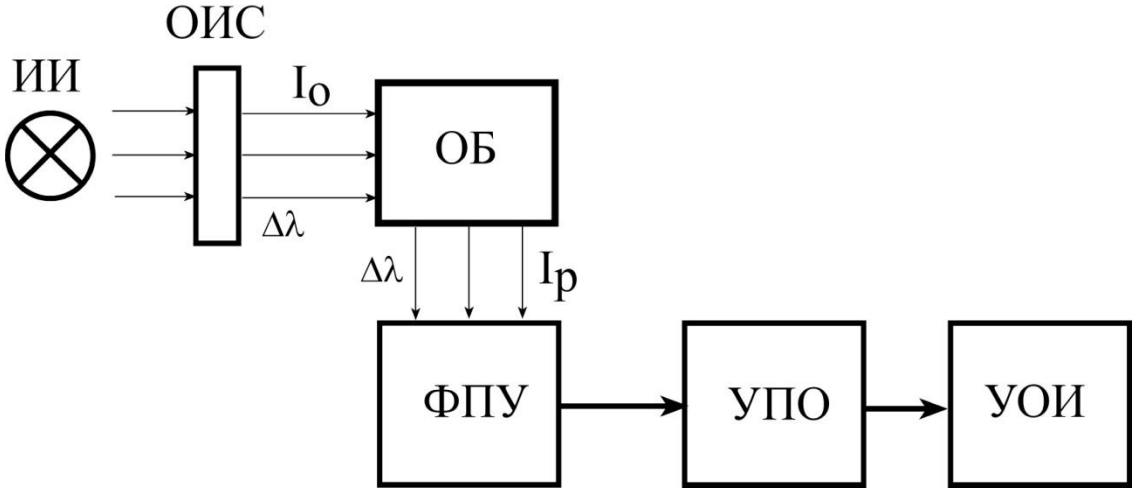


a=2 λ

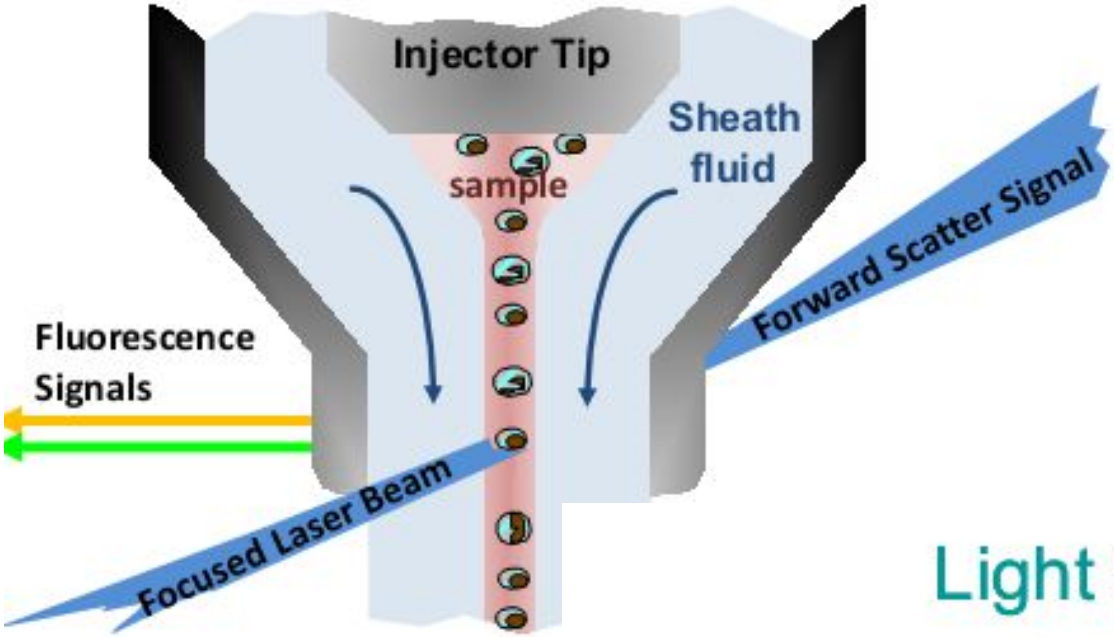


Индикатрисы рассеяния света для частиц разных размеров

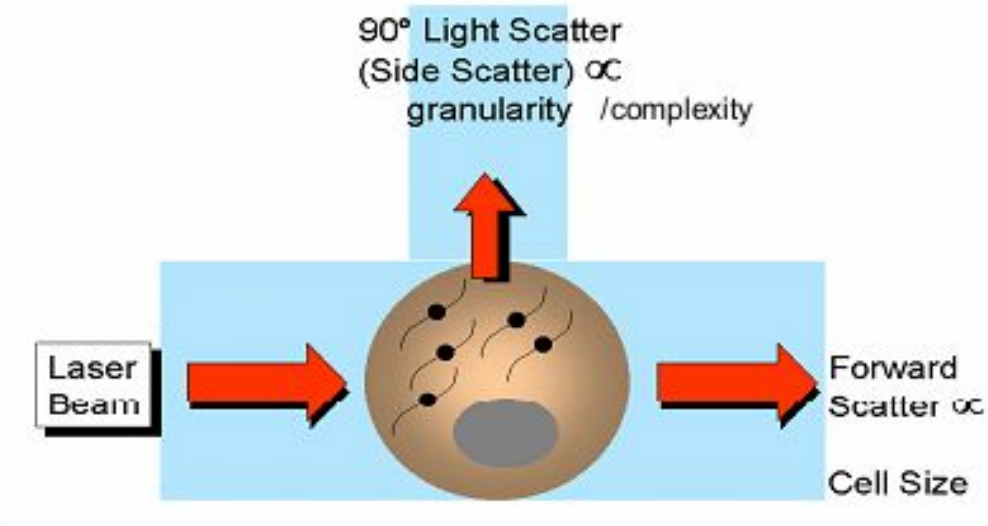
Схема нефелометра



Io – падающий световой поток;
Ip – световой поток рассеянный средой

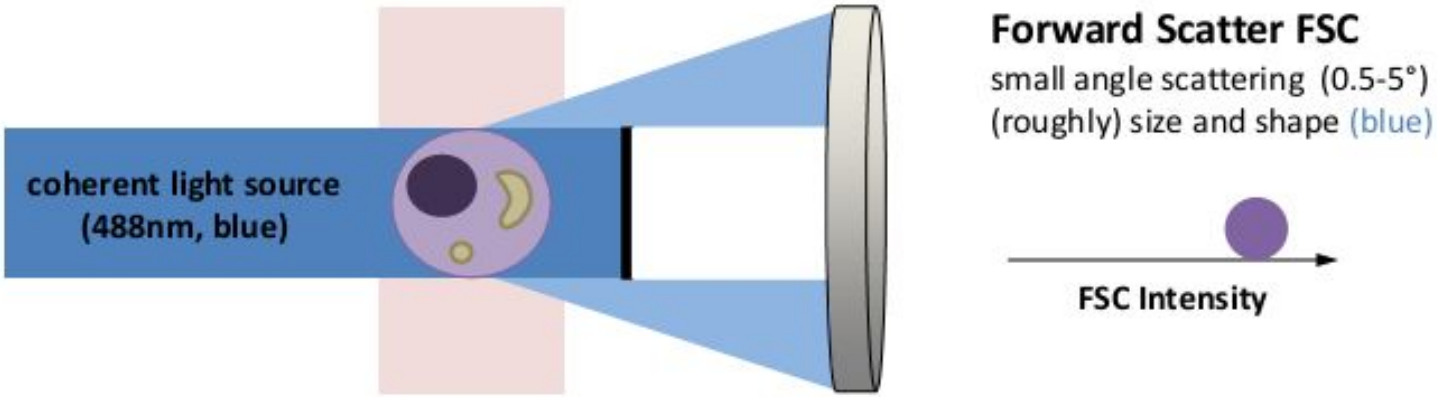


Light Scatter



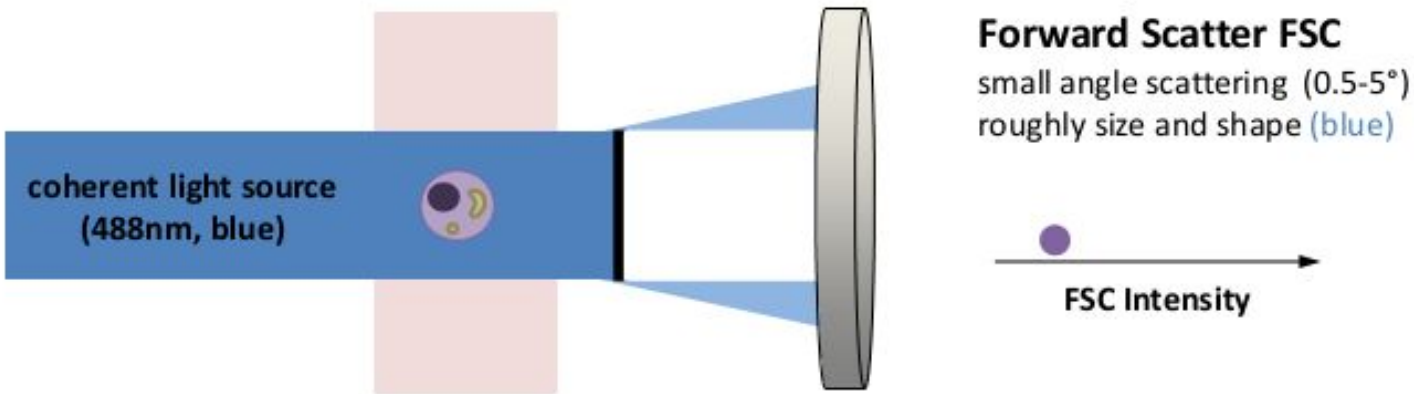
Определение размера

Light Scattering



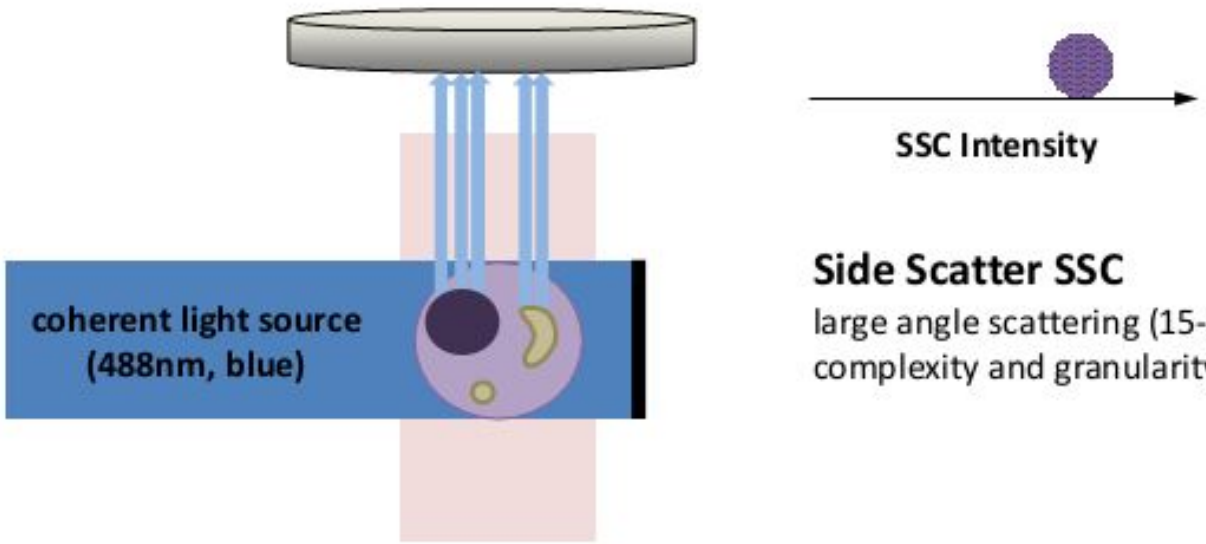
Определение размера

Light Scattering



Определение структуры

Light Scattering

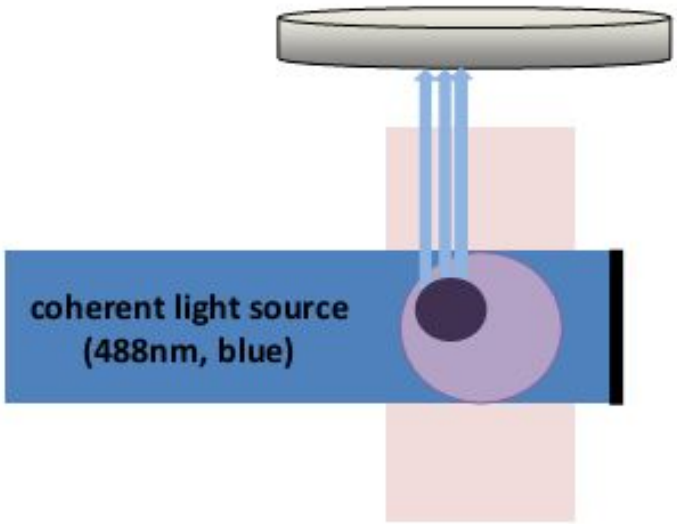


Side Scatter SSC

large angle scattering (15-150°), darkfield, complexity and granularity (blue)

Определение структуры

Light Scattering



Side Scatter SSC

large angle scattering (15-150°), darkfield, complexity and granularity (blue)

Люминесценция

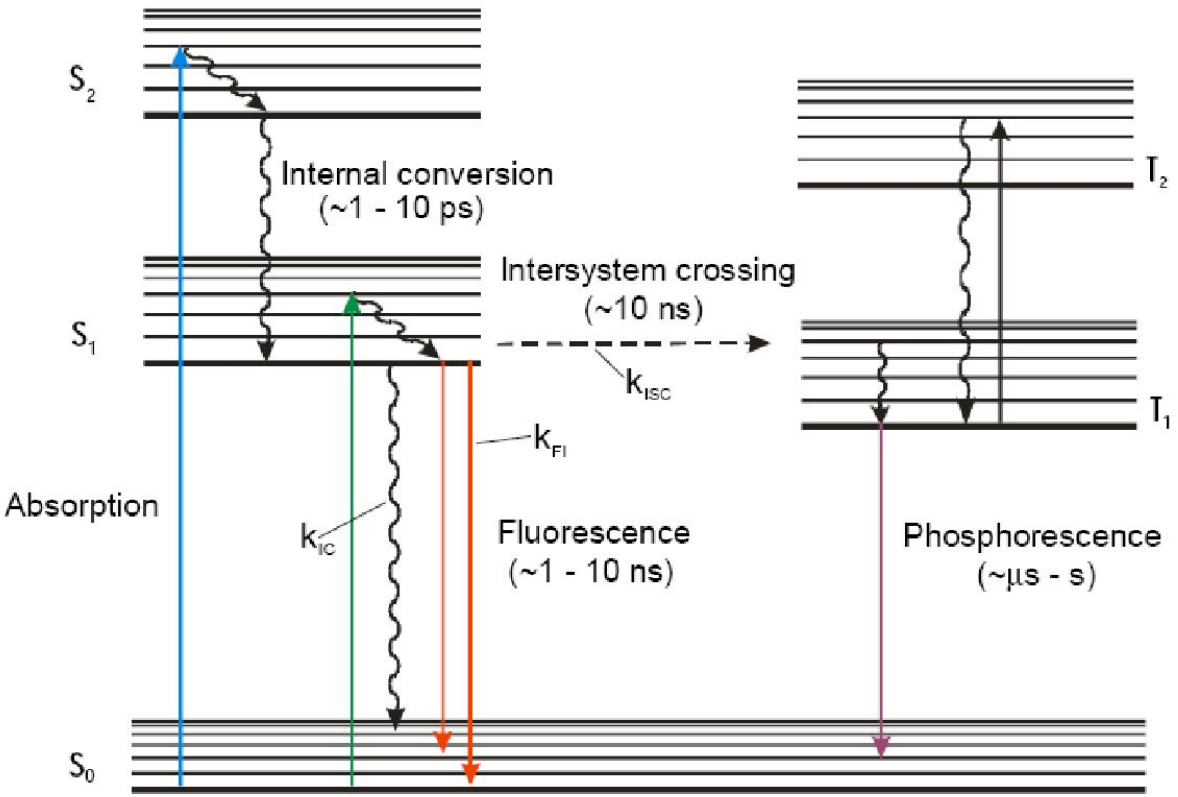


Схема энергетических переходов в молекуле при возникновении люминесценции

По длительности свечения различают флуоресценцию – свечение, возникающее и исчезающее практически мгновенно (1–10 нс), и фосфоресценцию – длительное свечение (от мс до нескольких секунд и более) после удаления источника возбуждения.

Перевод молекул в возбужденное состояние возможен различными способами и в связи с этим различают:

- фотолюминесценцию
- хемилюминесценцию
- электролюминесценцию
- катодолюминесценцию
- рентгенолюминесценцию
- термолюминесценцию
- радиолюминесценцию

В медикобиологических исследованиях наиболее широко используют явление фотолюминесценции (флуориметрию), В качестве возбуждающего источника чаще всего применяют УФ. Этот метод обладает значительно большей чувствительностью, чем другие фотометрические методы и используются для обнаружения и идентификации веществ.

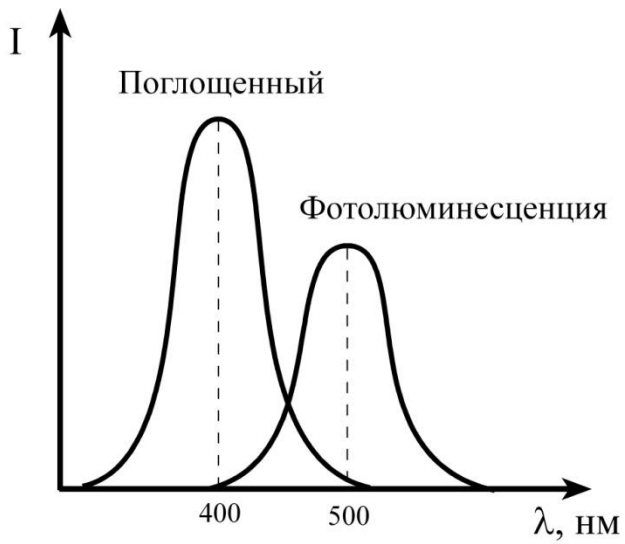
Явление люминесценции – основные закономерности

Так как энергия перехода между уровнями для данного атома всегда постоянна, то

спектр излучаемого света при флуоресценции **не зависит** от **спектра возбуждающего** излучения и специфичен для данного вещества (закон Вавилова).

Явление люминесценции – основные закономерности

правило Стокса, согласно которому **спектр флуоресценции** и его максимум по сравнению со спектром абсорбции **смещен в сторону больших длин волн**



Спектры поглощенного излучения
и возбужденного свечения (з-н Стокса)

Достаточно широко используется флуоресценция для обнаружения белков и оценки их состояния. Каждый вид белков имеет собственный спектр флуоресценции. При данной методике изучается специфичность формы кривых и расположении максимумов в спектре люминесценции. По флуоресценции живой клетки можно оценить функциональное состояние клетки.

Явление люминесценции – основные закономерности

Количественное преобразование возбуждающей энергии в энергию флуоресценции определяется **энергетический выходом** люминесценции Е, который определяется через отношение энергии люминесценции к энергии возбуждения, поглощенной в веществе:

$$\frac{I_л}{I_п} = E = \left(\frac{I_л}{I_0}\right)\left(1 - \tau_л\right)$$

Определение энергетического выхода люминесценции

где $I_л$ – интенсивность люминесценции, I_0 – интенсивность излучения, $I_п$ – интенсивность поглощенного излучения, $\tau_л$ - коэффицент пропускания при люминесценции

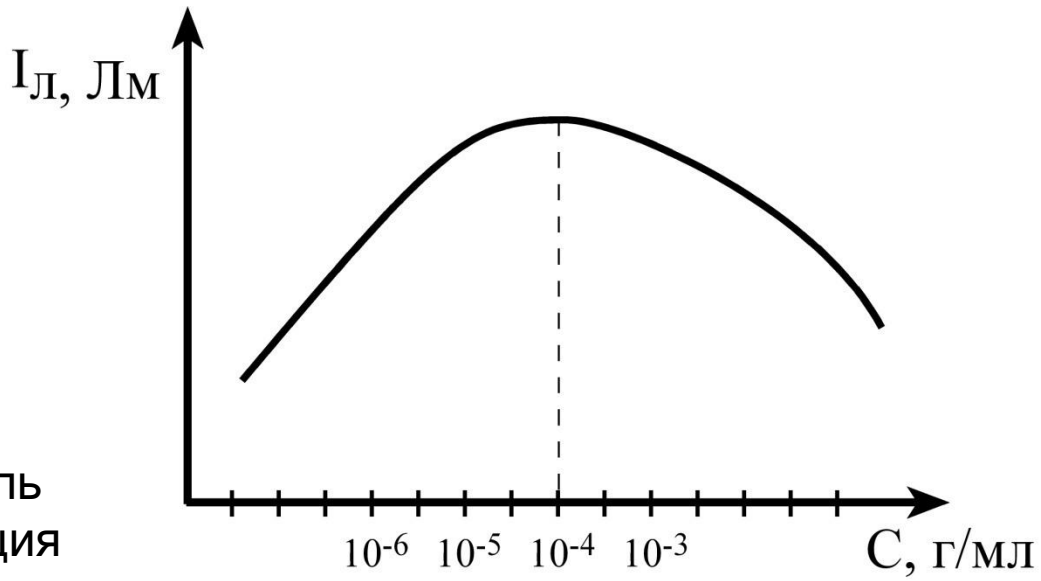
Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации флюоресцирующего вещества

Определение концентрации вещества
по люминесценции

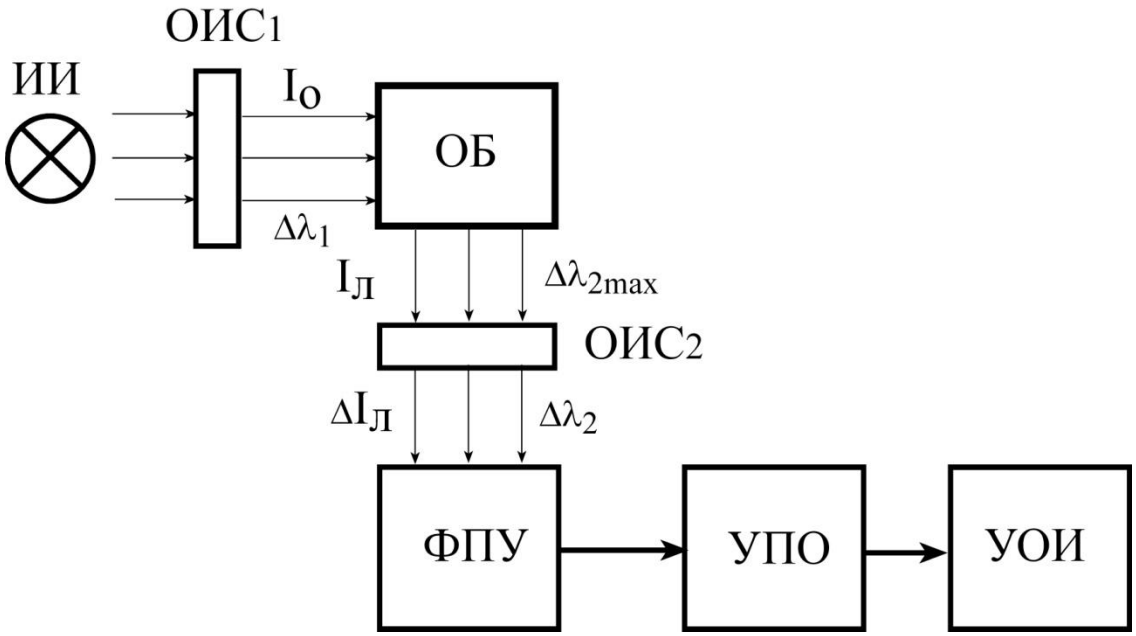
$E = m_\lambda Cl,$

$C = E/m_\lambda l$

где m_λ – удельный показатель люминесценции, C – концентрация флуорофора, l – толщина исследуемой среды.



Структура флуориметра



ОИС1 – полосовой фильтр, пропускающий световой поток для возбуждения в полосе длин волн Δλ□; ОИС1 – полосовой фильтр, пропускающий излученный световой поток в полосе длин волн Δλ2; Io – падающий поток световой (возбуждающий) в полосе длин волн Δλ□ для исследуемого раствора; Iл –, излученный световой поток с максимумом излучения λ2; ΔIи – световой поток в полосе длин волн Δλ2

Поляриметрия

Определение концентрации оптически активного вещества

$$C = \frac{\alpha}{[\alpha]_D^{20} \cdot l}$$

C– концентрации оптически активного вещества (г/см^3)

l – длины (дм) кюветы

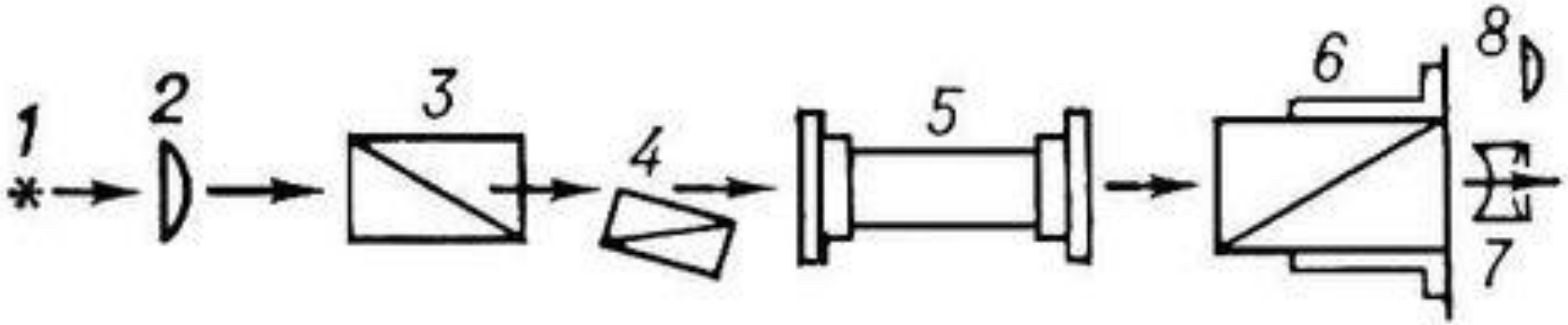
$[\alpha]_0^{20}$ – удельное вращение – угол вращения при концентрации вещества 1 г/мл, длине трубки 10 см, температуре 20^0 С и желтом свете (D линия Na) – λ=589,3 нм.

α – экспериментально измеренный угол вращения

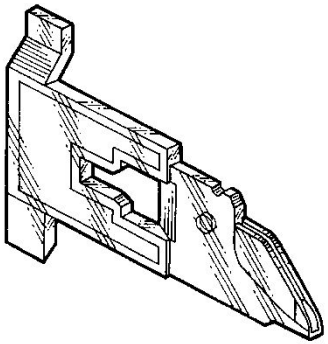
Примеры оптических характеристик некоторых веществ

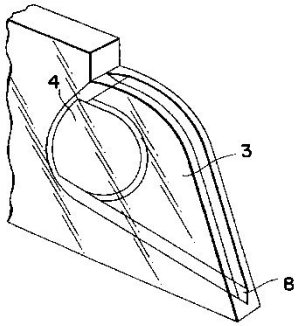
Раствор	$[\alpha]_0^{20} \frac{град \cdot см^3}{дм \cdot г}$	Направление вращения плоскости поляризации
Тростниковый сахар	+66,44	Правое
Виноградный сахар	+52,5	Правое
Фруктовый сахар	-91,9	Левое

Схема полутеневого поляриметра

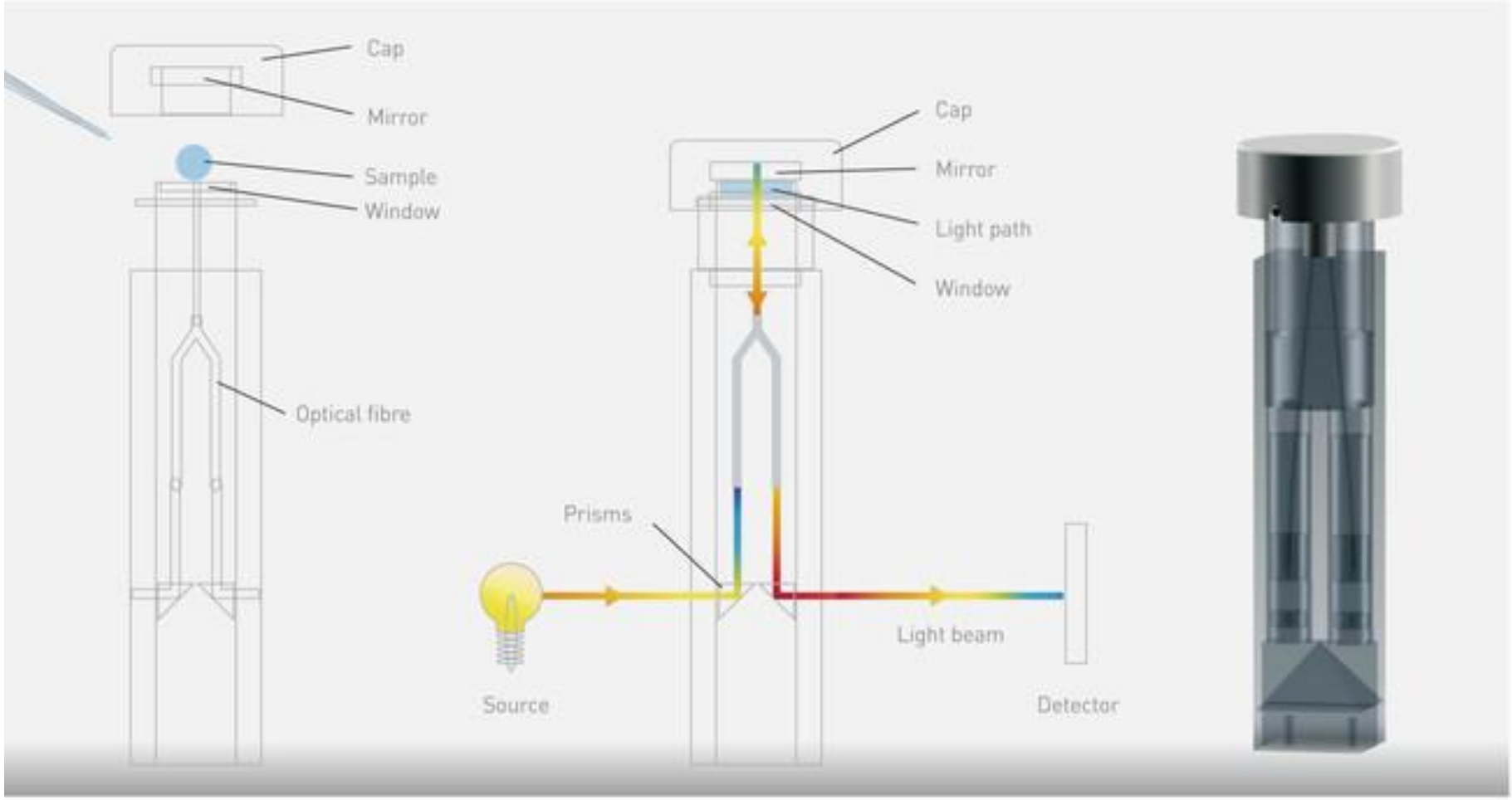


1 – источник света; 2 – конденсор; 3–4 – полутеневой поляризатор; 5 – трубка с измеряемым оптически-активным веществом; 6 – анализатор с отсчётным устройством; 7 – зрительная труба; 8 – окуляр отсчётного устройства (например, микроскопа-микрометра).

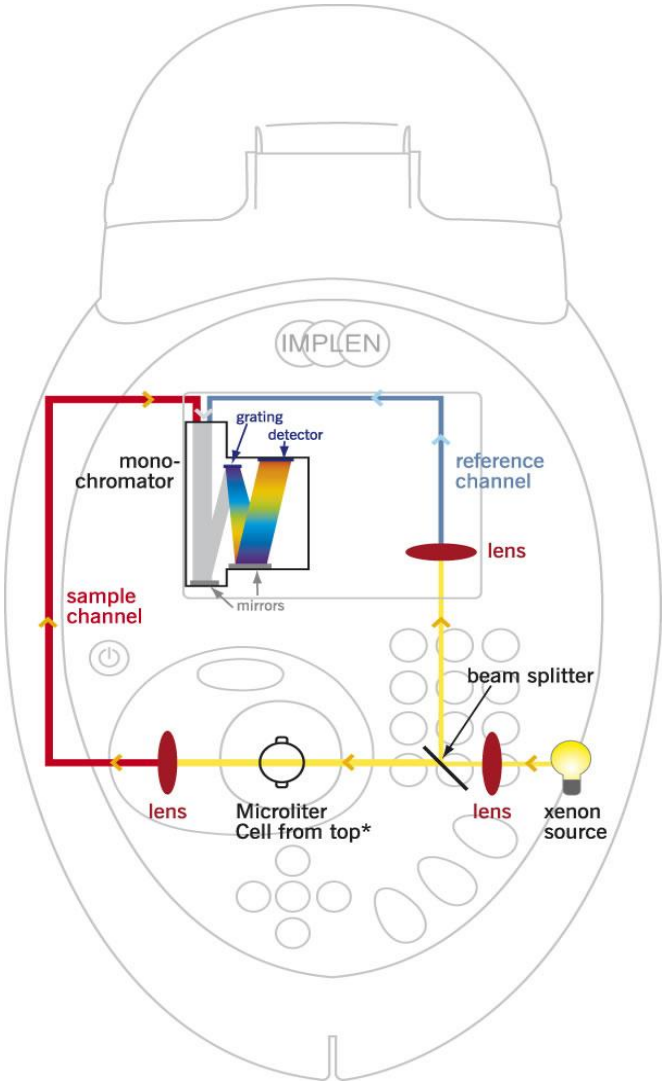


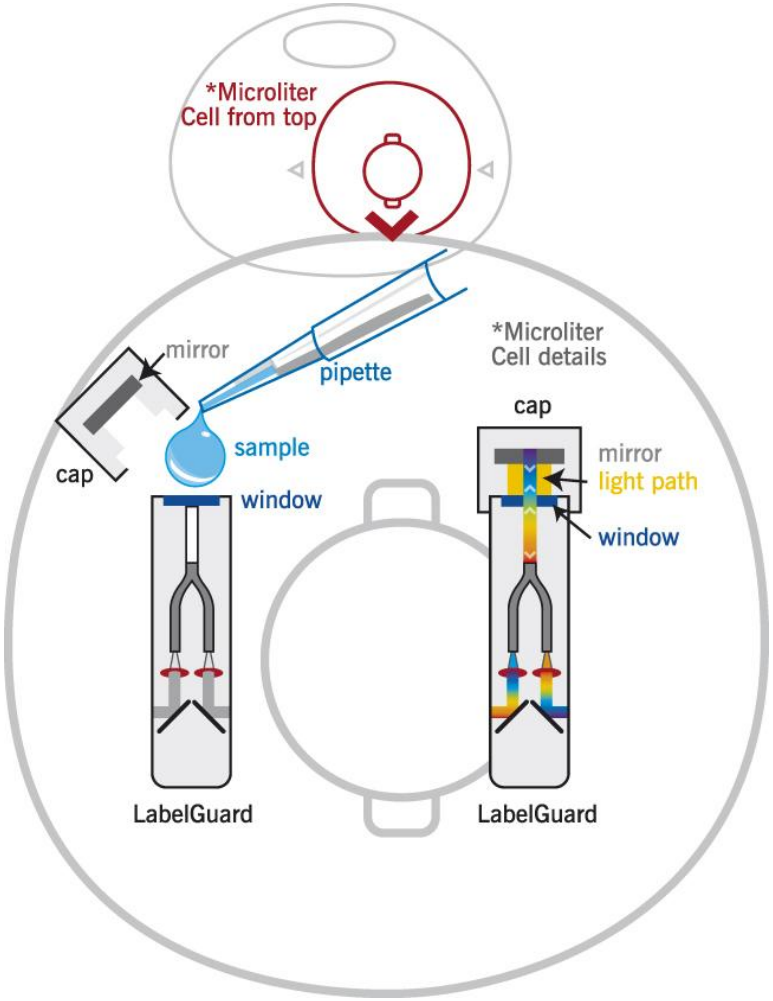


Микрокюветы для оптических исследований с капиллярным заполнением



Конструкция и принцип действия специализированной кюветы _TrayCell, фирмы Hellma



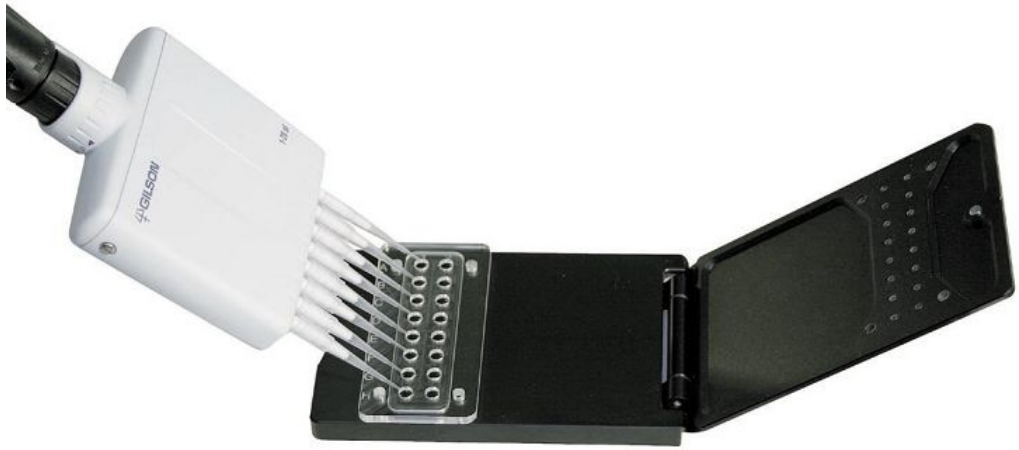


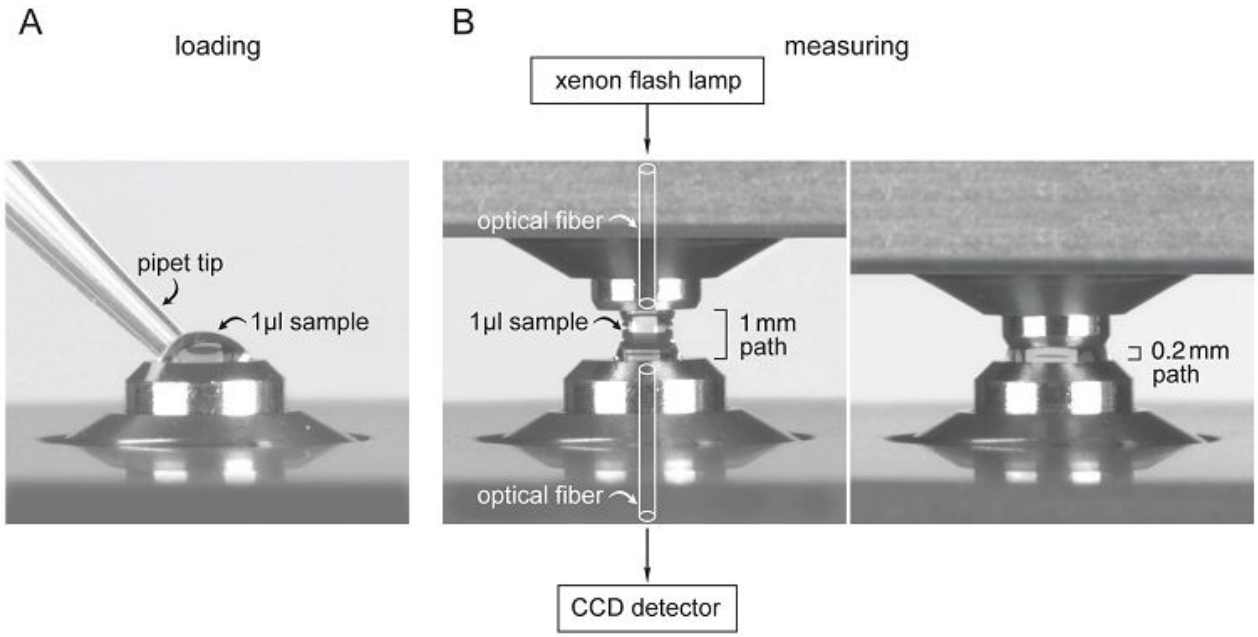
Конструкция и принцип действия прибора NanoPhotometer

Фирма Biotec, дистрибьютор Биолайн
- необходим компьютер
- спектральный диапазон 200 - 999 Нм
- анализ 16 капель (от 2 мкл) + кювета на Take3 Plate или на стандартных микропланшетах (от 6 до 384 лунок)
- плотность от 0 до 4.0 А (разрешение 0.0001)

Вид и характеристики прибора Epoch MultiEpoch Multi-Epoch Multi-Volume Spectrophotometer System

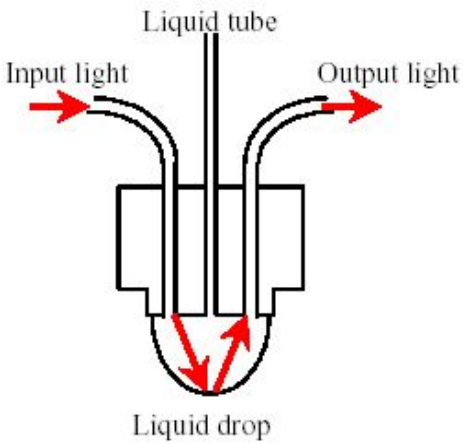
Прибор Infinite 200 NanoQuant

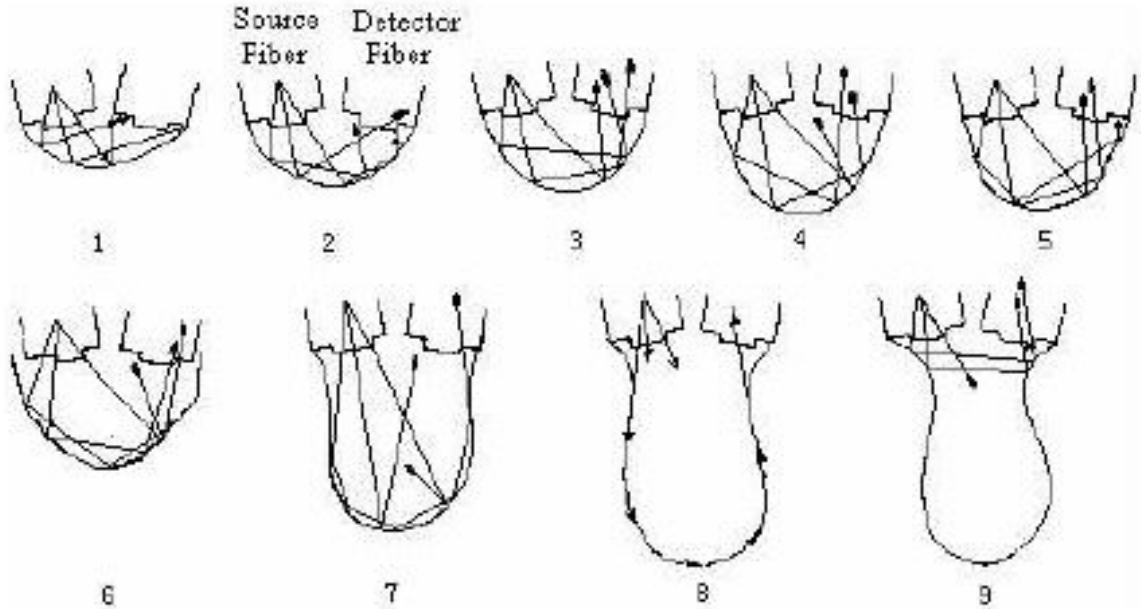


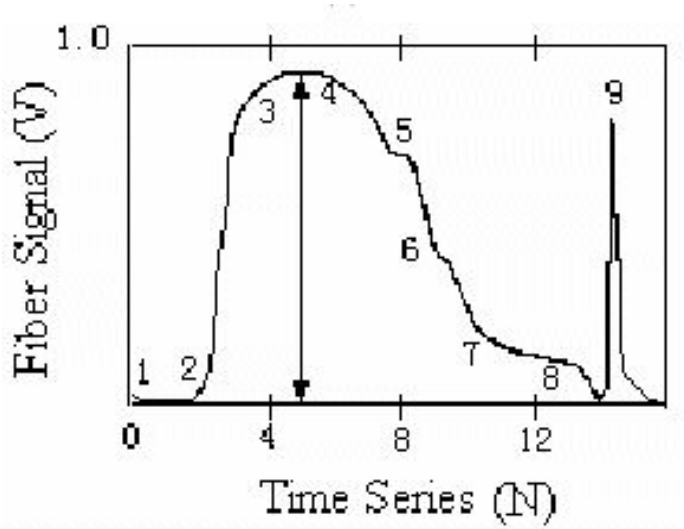


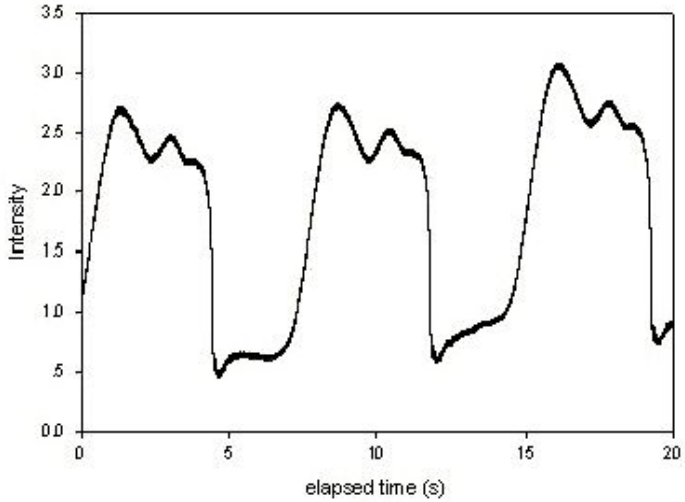
Вид рабочей области прибора Nanodrop

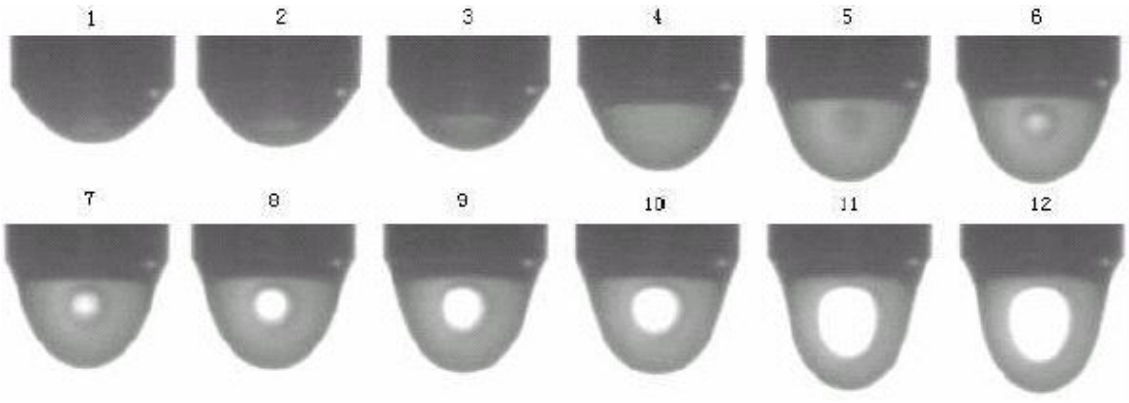
Многокапельный спектрофотометр NanodropNanodrop 8000

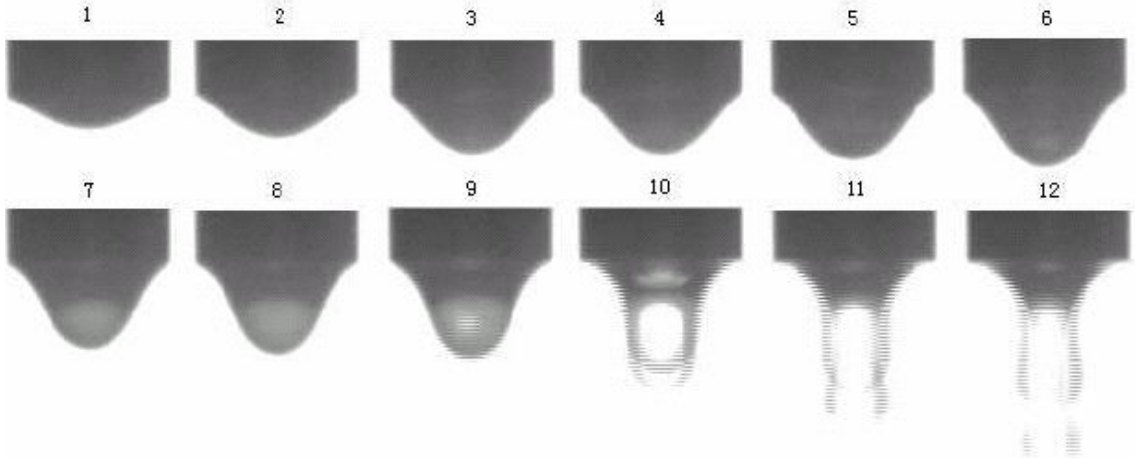

Liquid tube
Input light
Output light
Liquid drop


Source Fiber
Detector Fiber
1
2
3
4
5
6
7
8
9

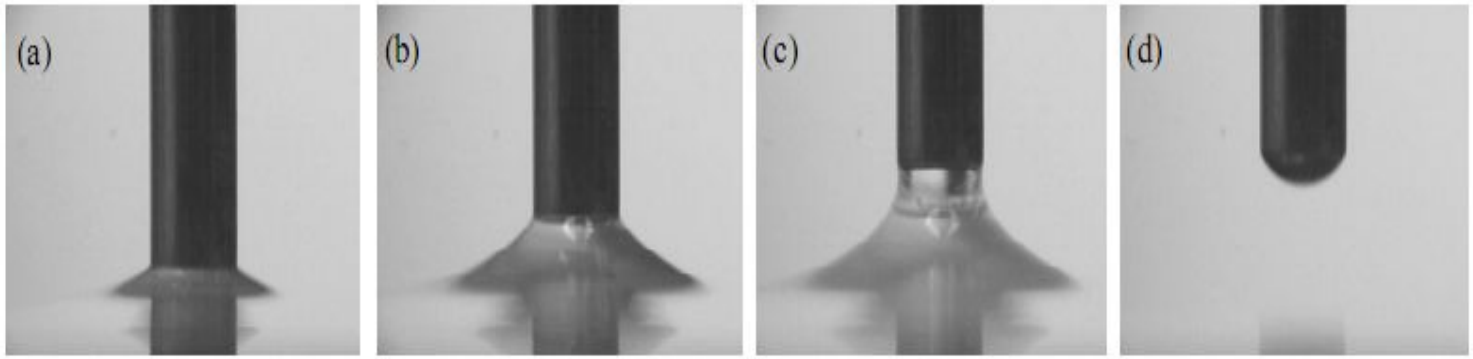

Fiber Signal (V)
1.0
0
4
8
12
Time Series (N)
1
2
3
4
5
6
7
8
9

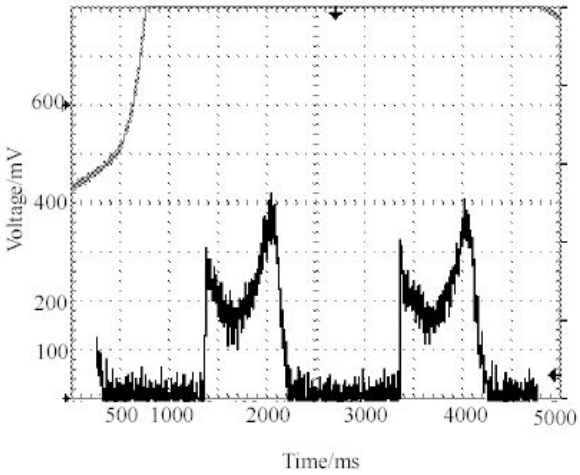

Intensity
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
.5
0.0
0
5
10
15
20
elapsed time (s)

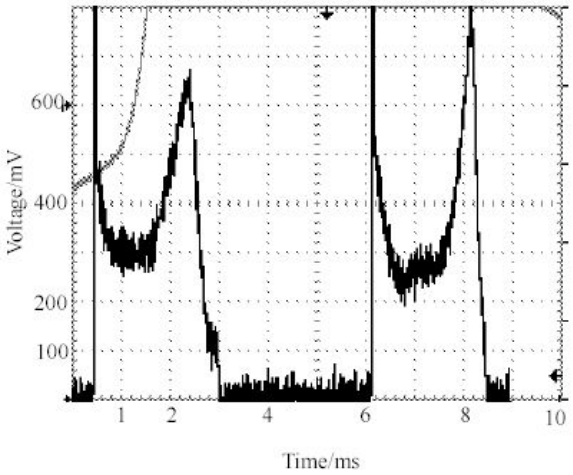




Кинограммы изменения формы капель в процессе роста для чистой воды (а) и 100%-ного этилового спирта (б)







1% раствор сахарозы растительное масло

Биохимические анализаторы

Регистрируемые параметры

- ферментов плазмы и сыворотки крови
- основные метаболиты - сахара, азотистые основания и др.
- электролиты плазмы крови

Биохимические анализаторы

Биохимические анализаторы предназначены для частичной или полной автоматизации анализа крови. В их основу положен оптический измерительный модуль и калориметрические методы измерений.

- **Полуавтоматические биохимические анализаторы**
- **Полностью автоматические биохимические анализаторы**

Биохимические автоанализаторы могут быть подразделены (несколько условно) на три основных типа.

1. Одноцелевые биохимические автоанализаторы, с помощью которых в анализируемой пробе определяется лишь один компонент биологической жидкости и ткани. К числу таковых может быть отнесен, например, анализатор "Глюкоза-2" фирмы "Beckman".

2. Автоанализаторы для определения так называемых родственных компонентов. Это, например, автоанализатор аминокислот, принцип действия которого основан на хроматографическом их разделении (по Штейну и Муру); автоматический атомно-абсорбционный пламенный спектрофотометр.

3. Многоцелевые биохимические автоматические устройства, предназ начающиеся для установления содержания в биологических жидкостях большого количества различных по химической природе компонентов.

В клинической биохимии применяется широкий спектр аналитических методов, однако доминирующими являются фотометрические методы, основанные на измерении оптической плотности реакционной смеси.

Схема фотометрического анализа в биохимическом исследовании

В проточно-инжекционном анализе в качестве способов детектирования используются: абсорбционная фотометрия (42%), флюориметрия, турбидиметрия и др. (28%), электрихимическая детекция (29%), иные способы детекции (около 1%).

В зависимости от характера химической процедуры исследовании различают 4 основные группы методов:

К 1-ой из них относят способы анализа, основанные на обычной "неферментативной" химической реакции.

Ко 2-ой - способы определения субстратов с помощью ферментов.

К 3-ей - методы исследования активности ферментов.

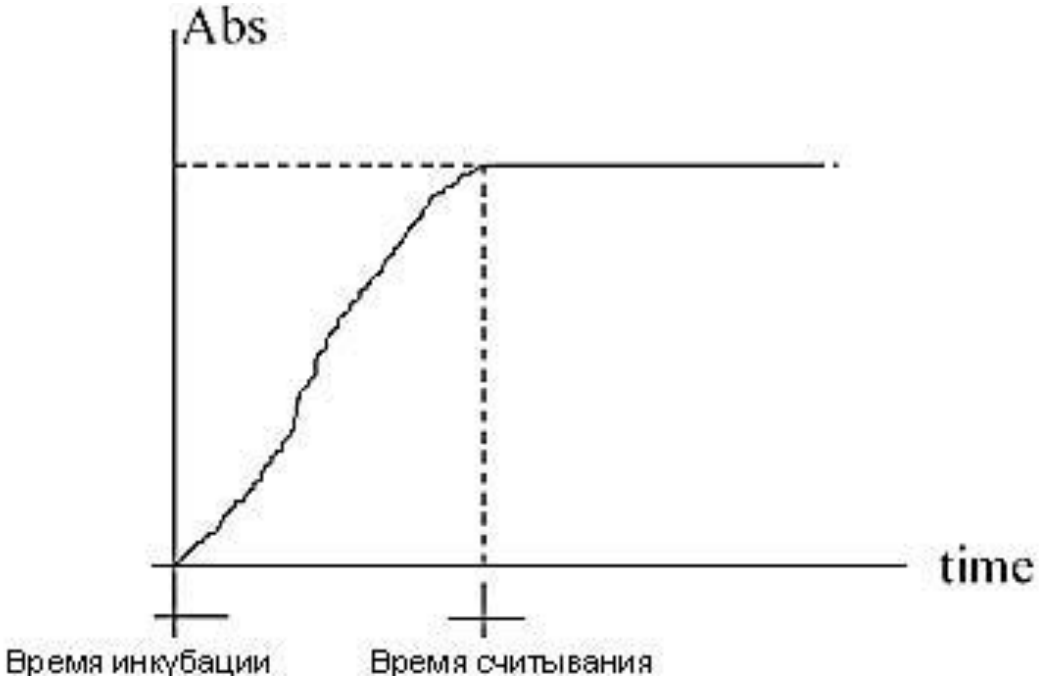
К 4-ой - методы иммунохимического анализа.

Основными узлами биохимических автоанализаторов являются:

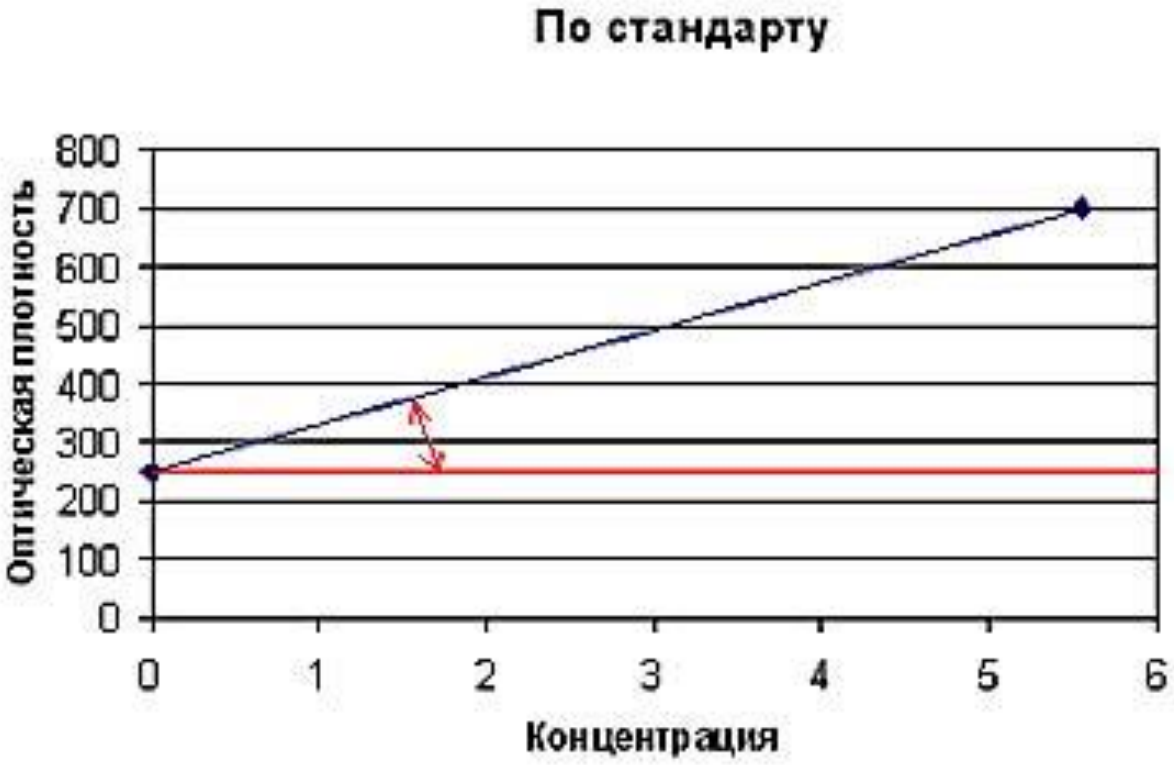
- 1) Карусели (картриджи) с исследуемым биологическим материалом и реагентами.
- 2) Дозаторы (манипуляторы).
- 3) Блок измерения концентрации определяемого компонента.
- 4) Регистрирующее устройство.
- 5) Система управления комплексом перечисленных модулей.

Определение по конечной точке

После смешивания реактива и образца, начинается химическая реакция, которая сопровождается изменением оптической плотности (Abs). По истечении времени инкубации, реакция прекращается, и изменение оптической плотности также прекращается. И величина оптической плотности становится пропорциональной концентрации искомого вещества. В этот момент и производится измерение оптической плотности.



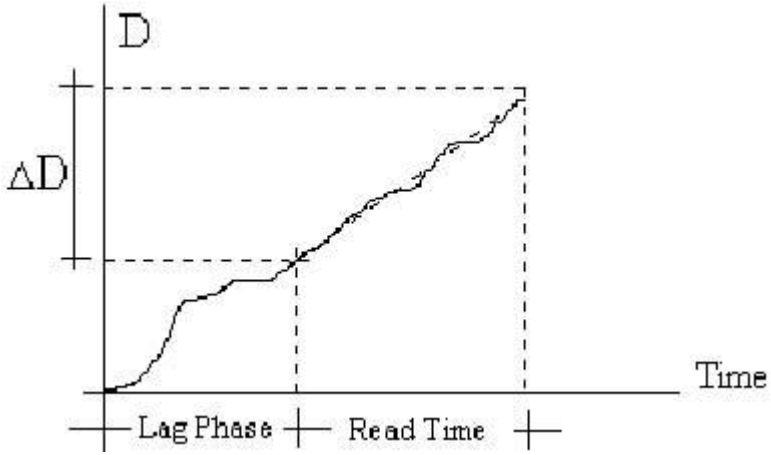
Калибровочный график



Получив калибровочный график, измеряя оптические плотности исследуемых образцов, можно высчитать концентрацию искомого вещества.

Кинетические методы измерения

Кинетические методы измерения – это методы, когда изменения оптической плотности регистрируются во времени и измеряется скорость изменения, которая пропорциональна либо концентрации исследуемого вещества, либо активности этого вещества (например, ферментов).

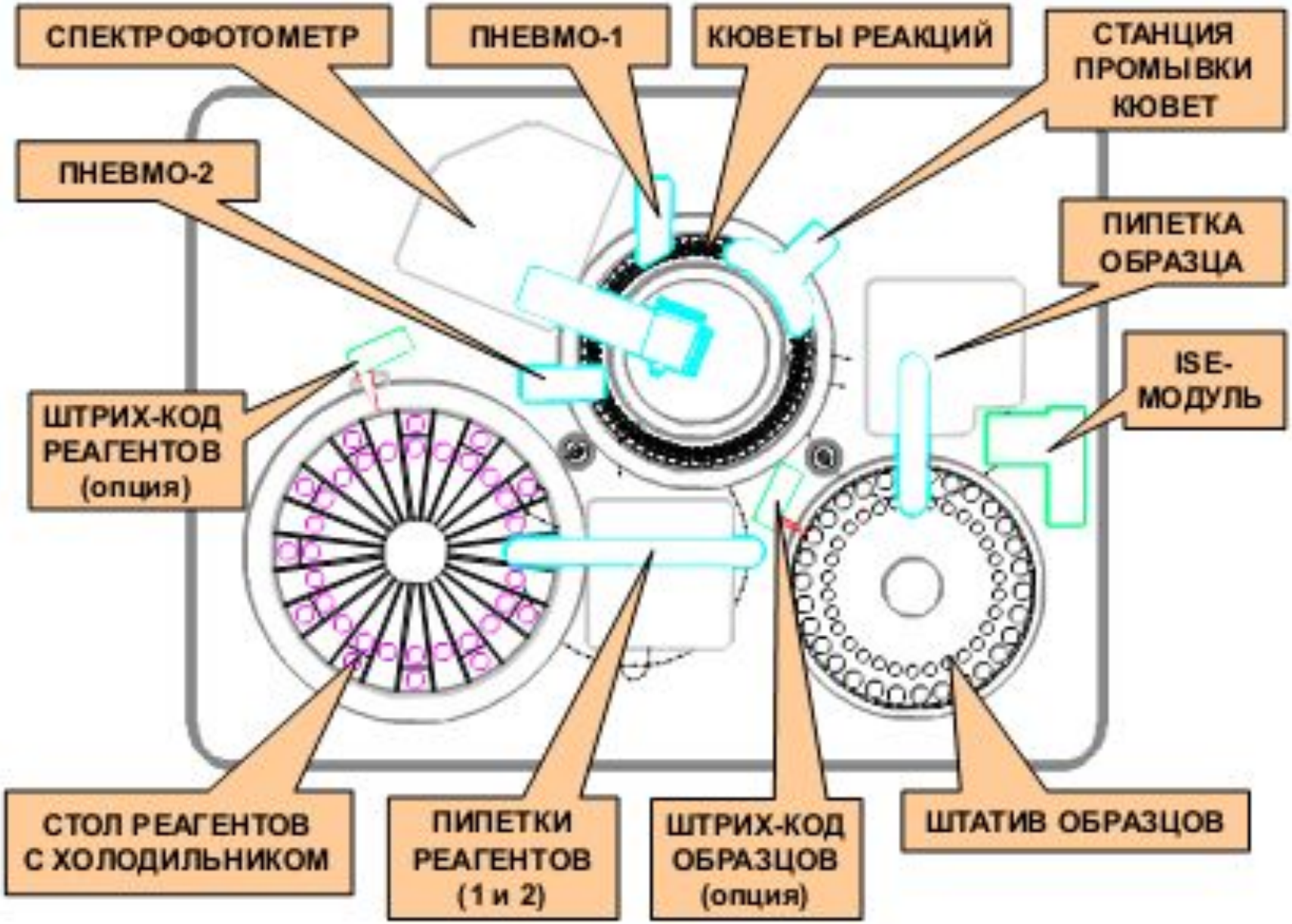


пример кинетического измерения

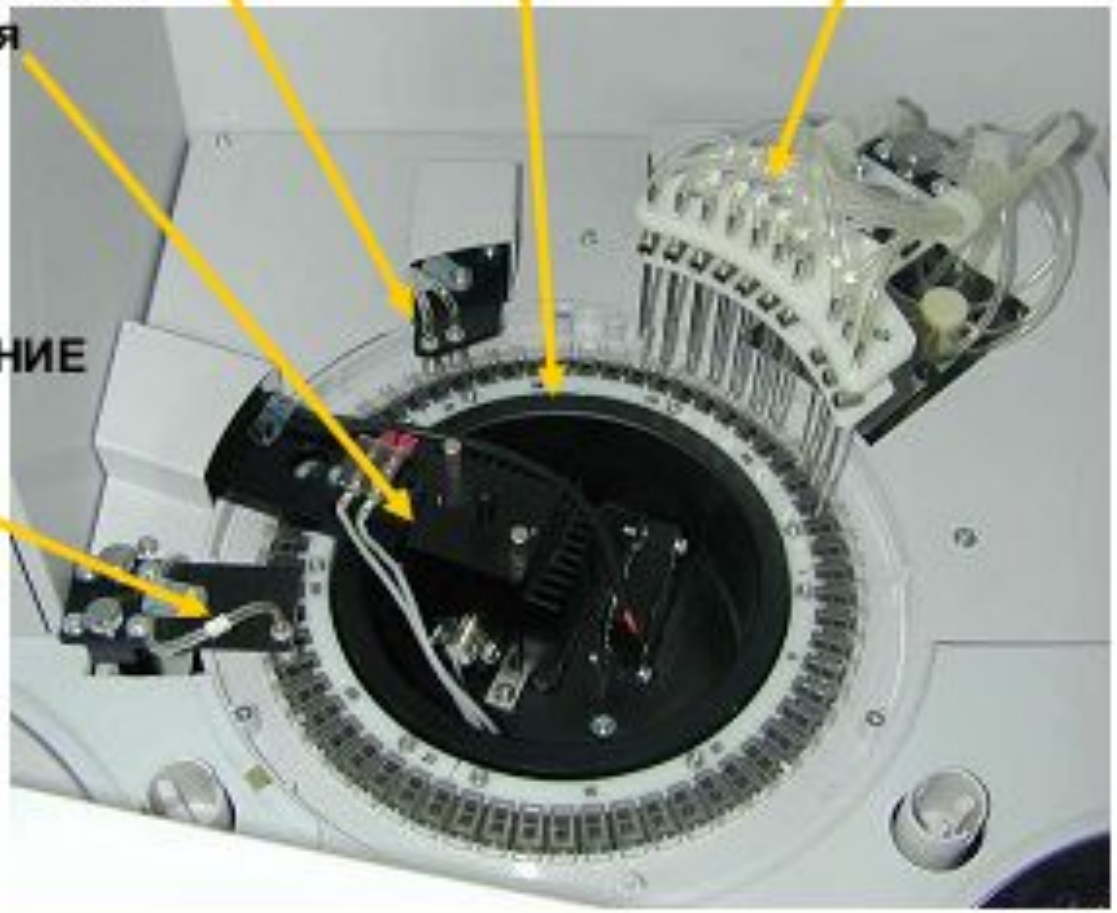
Расчет производится либо по фактору, либо по стандарту.

Основными узлами биохимических автоанализаторов являются:

- 1) Карусели (картриджи) с исследуемым биологическим материалом и реагентами.
- 2) Дозаторы (манипуляторы).
- 3) Блок измерения концентрации определяемого компонента.
- 4) Регистрирующее устройство.
- 5) Система управления комплексом перечисленных модулей.


СПЕКТРОФОТОМЕТР
ПНЕВМО-1
КЮВЕТЫ РЕАКЦИЙ
СТАНЦИЯ ПРОМЫВКИ КЮВЕТ
ПНЕВМО-2
ПИПЕТКА ОБРАЗЦА
ISE-МОДУЛЬ
ШТРИХ-КОД РЕАГЕНТОВ (опция)
СТОЛ РЕАГЕНТОВ С ХОЛОДИЛЬНИКОМ
ПИПЕТКИ РЕАГЕНТОВ (1 и 2)
ШТРИХ-КОД ОБРАЗЦОВ (опция)
ШТАТИВ ОБРАЗЦОВ

СТОЛ РЕАКЦИЙ



ИОН-СЕЛЕКТИВНЫЙ БЛОК ISE (калий, натрий, хлор)

ISE МОДУЛЬ
(легкий доступ)

СРОК СЛУЖБЫ ЭЛЕКТРОДОВ –

6 месяцев или 10 000 тестов

СРОК СЛУЖБЫ РЕФЕРЕНТНОГО ЭЛЕКТРОД –

12 месяцев

Автоматические биохимические анализаторы

- **“открытые” системы**

- “Открытые” системы оборудованы набором светофильтров для выполнения
- наиболее распространенных методик и допускают проведение анализа практи-чески на любых реагентах промышленного производства.

- **Режимы доступа:**
  - “тест за тестом”
  - свободный доступ “тест за тестом” и/или “пациент за пациентом”

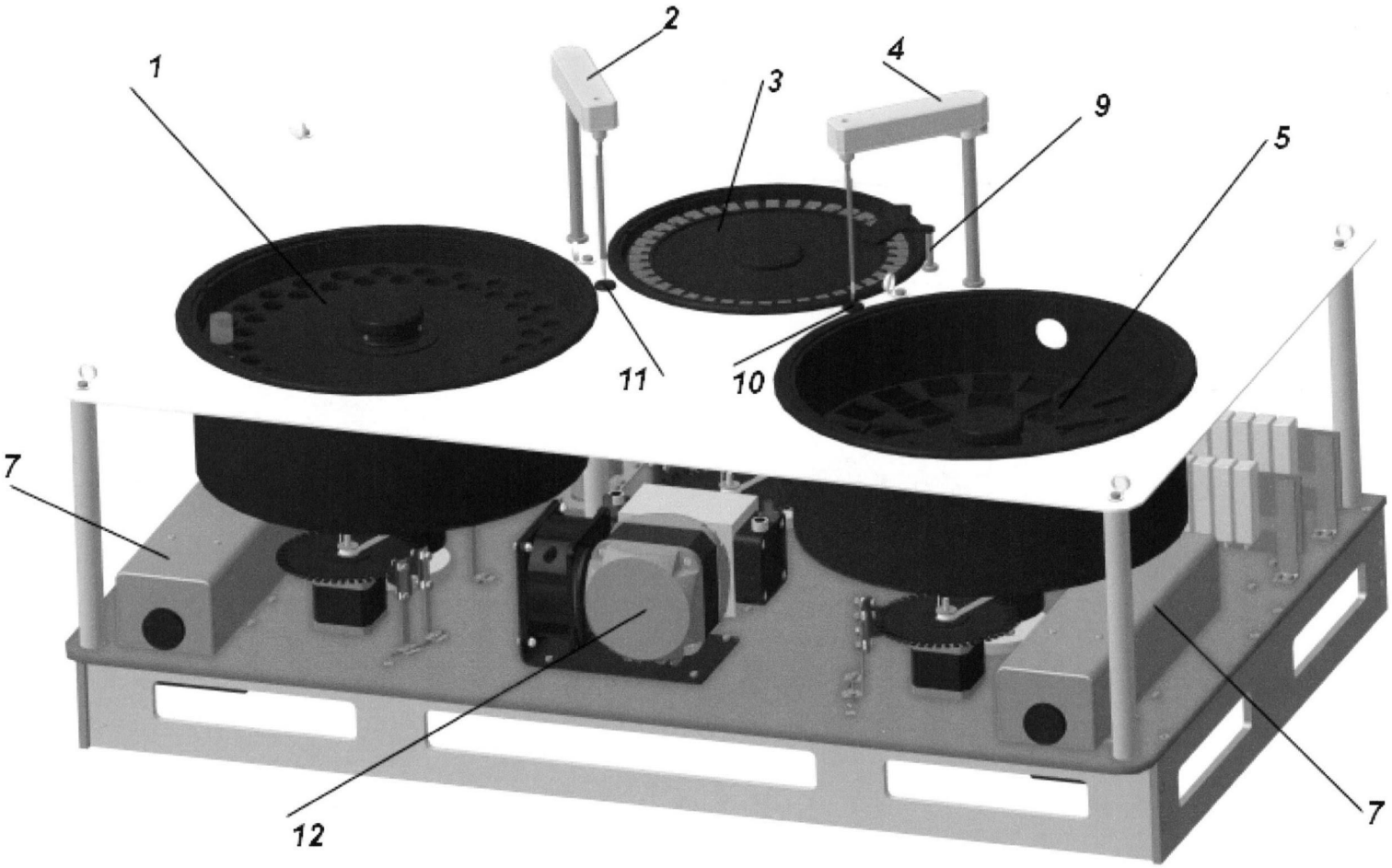
- **“закрытые” системы**

“Закрытой” является система, использующая лишь ограниченный спектр реагентов, предусмотренный изготовителем прибора.

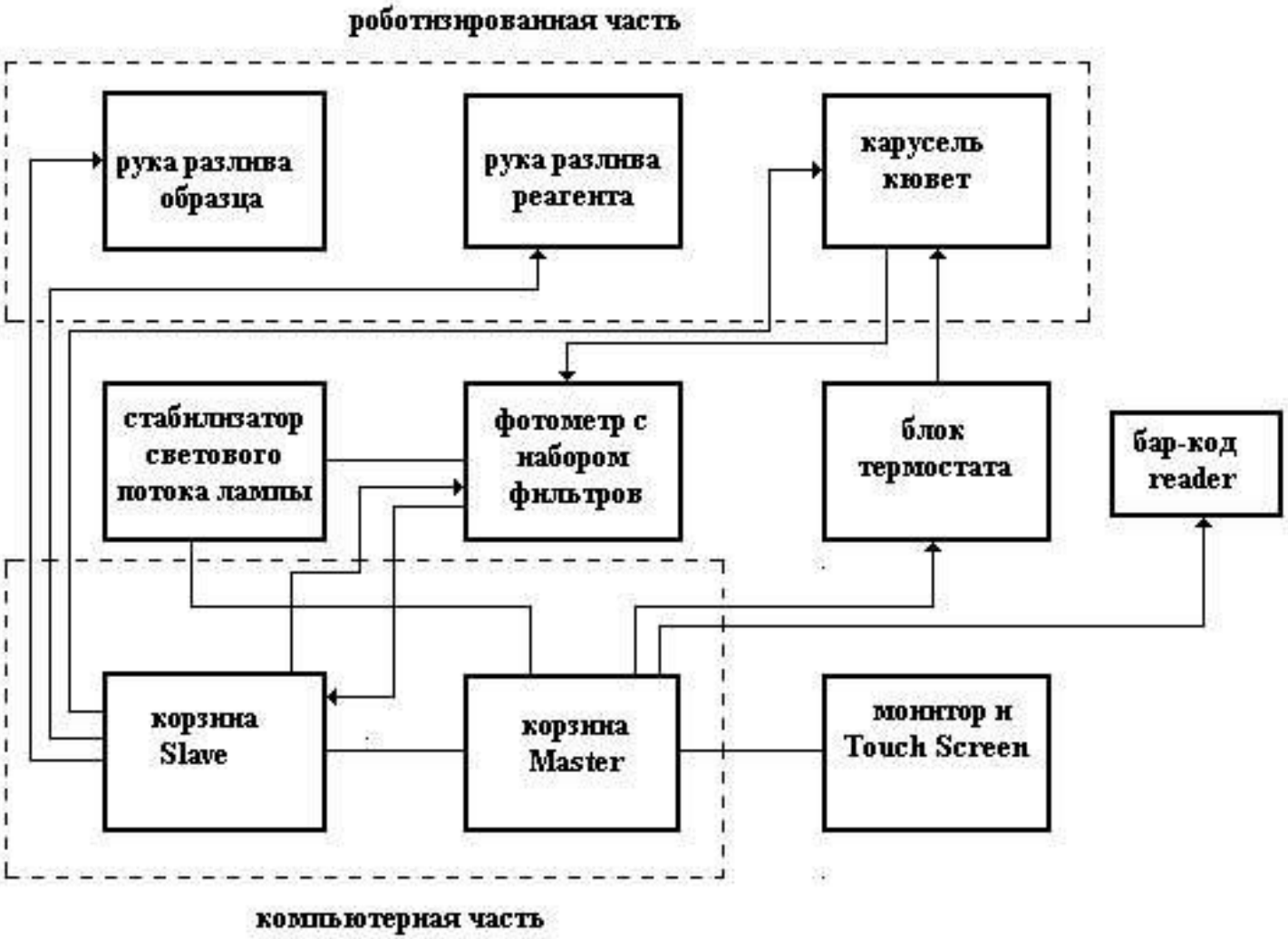
Биохимические анализаторы

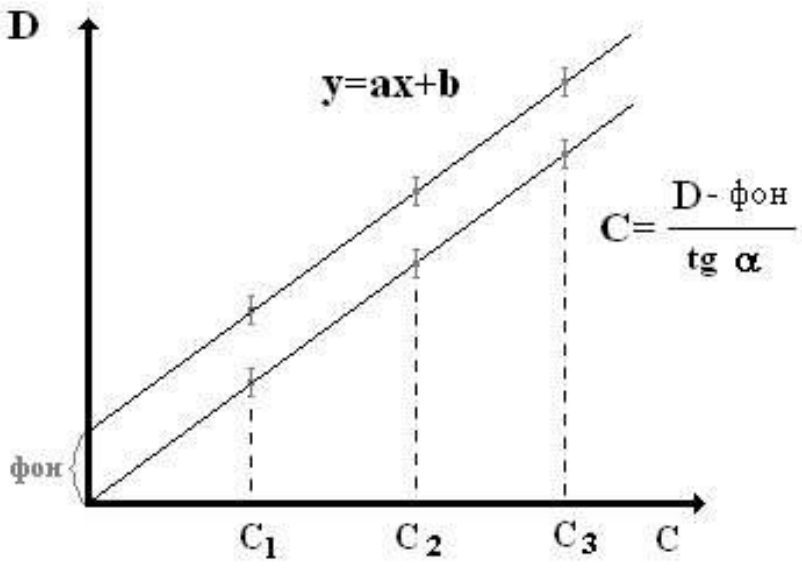
- **Конструкция реагентного блока:**
  - “линейный”
  - “карусель”
- **Конструкция блока проб:**
  - “линейный”
  - “карусель”
- **Конструкция реакционного узла:**
  - проточная кювета
  - термостатируемая платформа с пробирками

High Performance Diagnostic System


1
2
3
4
9
5
11
10
7
12
7

Блок схема автоматического анализатора “ABBOTT Spectrum“





Калибровочная кривая при измерениях по конечной точке

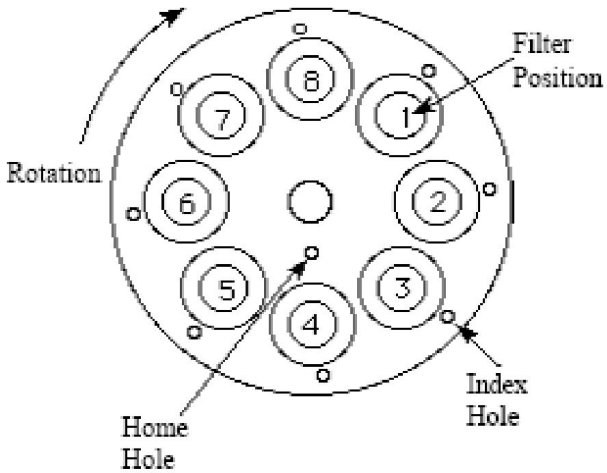


Figure #4.7.1a Filter Wheel Postions

Основные преимущества

1. Экономичность. Если при работе на ФЭКе обычно требуется 3-4 мл реактива, то при выполнении исследований на автоанализаторе всего лишь 350 - 500 мкл (и менее).

2. Использование небольшого объема анализируемой биологической жидкости (3 - 7 мкл)

3. Высокая производительность (до 800 и более исследований в час).

4. Гибкость в работе. Обеспечивается возможностью использования разных режимов определения: по конечной точке, двух- многоточечной кинетике, с привлечением технологии турбидиметрии (иммунонефелометрии), ионометрии, поляризационной флюориметрии и других.

5. Осуществление контроля качества. В современных автоанализаторах заложено несколько используемых для этого программ.

6. Программное сохранение базы данных.

7. Связь с компьютерами

8. Широкие возможности измерительного модуля. В отличие от обычных фотоэлектроколориметров, позволяющих производить замер оптической плотности растворов в пределах до 0,2 - 0,7 ед., современные биохимические автоанализаторы позволяют регистрировать абсорбцию (при условии соблюдения закона Бугера-Ламберта-Беера) в диапазоне до 2,5 ед. А: это достигается использованием мощного источника облучения и более чувствительных приемников света.

9. Надежность устройства, связанная с применением в нем новейших технологий.

10. Многие из современных биохимических автоанализаторов оснащены также ионоселективным блоком, позволяющим, в частности, проводить определения ионов калия, нгатрия, кальция, хлора потенциометрическим методом.

Метод “сухой химии”

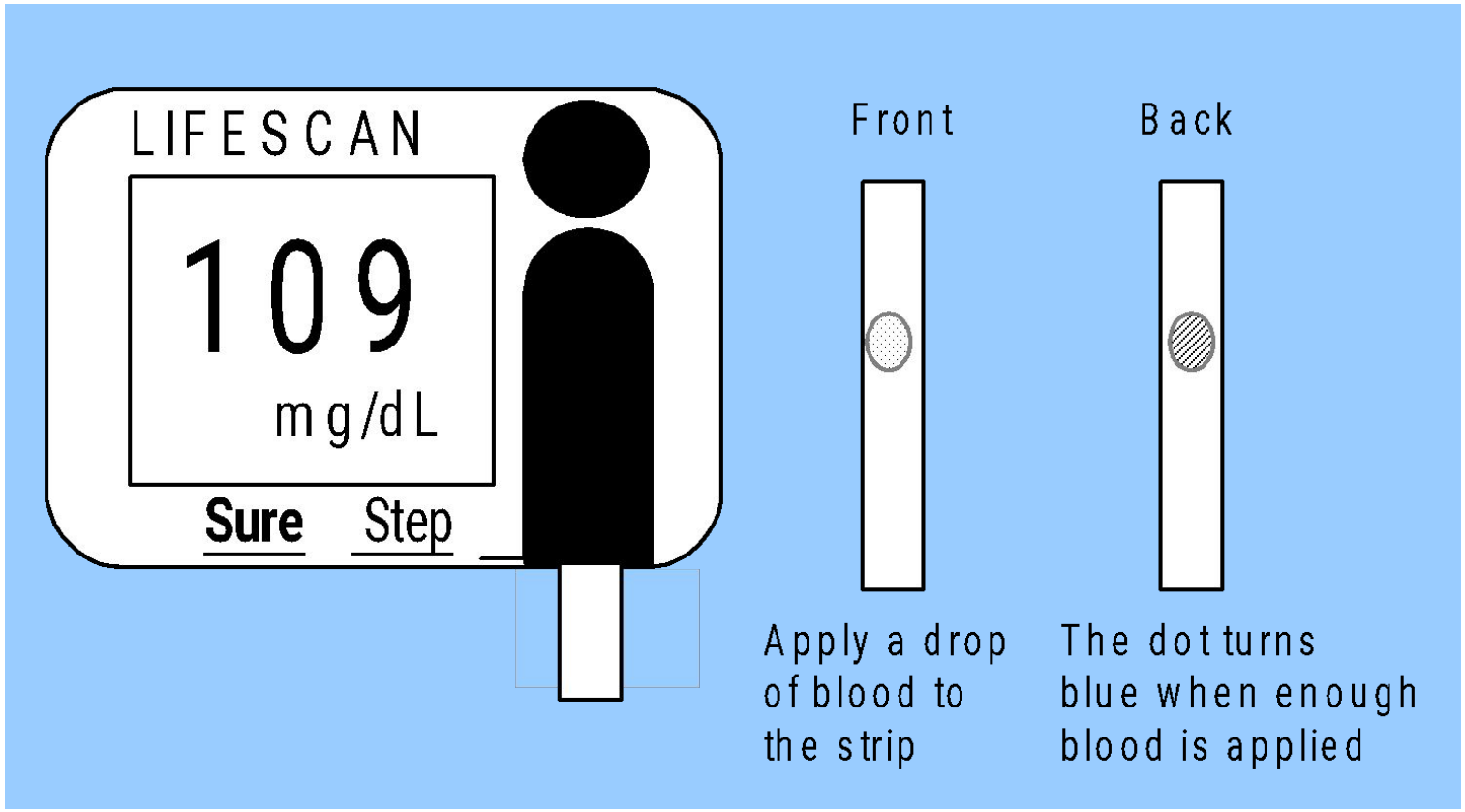


Figure 3.3 LifeScan, Inc., a system by Johnson and Johnson for self-monitoring glucose levels.

СПОСОБЫ РЕГИСТРАЦИИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНОЙ РЕАКЦИИ

- биохимические
  - «мокрая» химия
    - реактивы для традиционной биохимии
  - «сухая» химия
    - полуколичественная (тест-полоски Uriscan, Boehringer Mannheim)
    - количественная (отражательные фотометры типа One Touch и тест-полоски к ним)
- электрохимические (ферментативно-амперметрические)
  - ферментные электроды мембранного типа (Biosen, Esat)
  - электрохимические элементы портативных глюкометров (Элта-Сателлит)

Методы определения глюкозы в сыворотке крови

Глюкозооксидазный метод

Сегодня наибольшее распространение получили методы, основанные на использовании фермента – глюкозооксидазы.

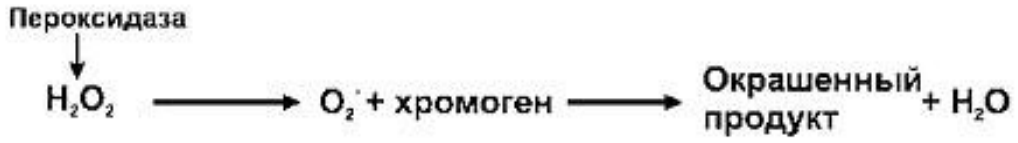
В основе метода лежит следующая реакция:

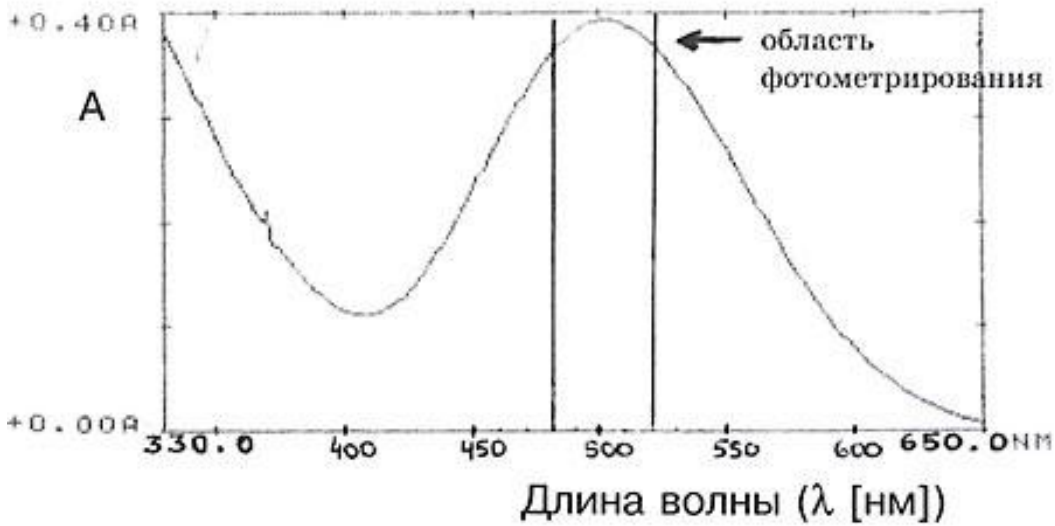
$$\text{Глюкоза} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{Глюкозооксидаза}} \text{Глюконовая кислота} + 2\,H_2O_2$$

В ходе реакции образуется в эквимолярных количествах перекись водорода. Т.е. концентрация образовавшейся перекиси водорода точно равна определяемой концентрации глюкозы.
Следовательно, использование глюкозооксидазной реакции, трансформировало задачу определения концентрации глюкозы в задачу определения концентрации перекиси водорода, которая, значительно проще первой.

Глюкозооксидазный метод признан сегодня одним из самых точных количественных методов определения глюкозы.

Наибольшее распространение получил **фотометрический биохимический метод**, молекулы перекиси водорода под действием фермента пероксидазы расщепляются с образованием активной формы кислорода – супероксид анион-радикала – O_2^-, который в свою очередь окисляет хромоген, что приводит к значительному изменению спектра поглощения хромогена.

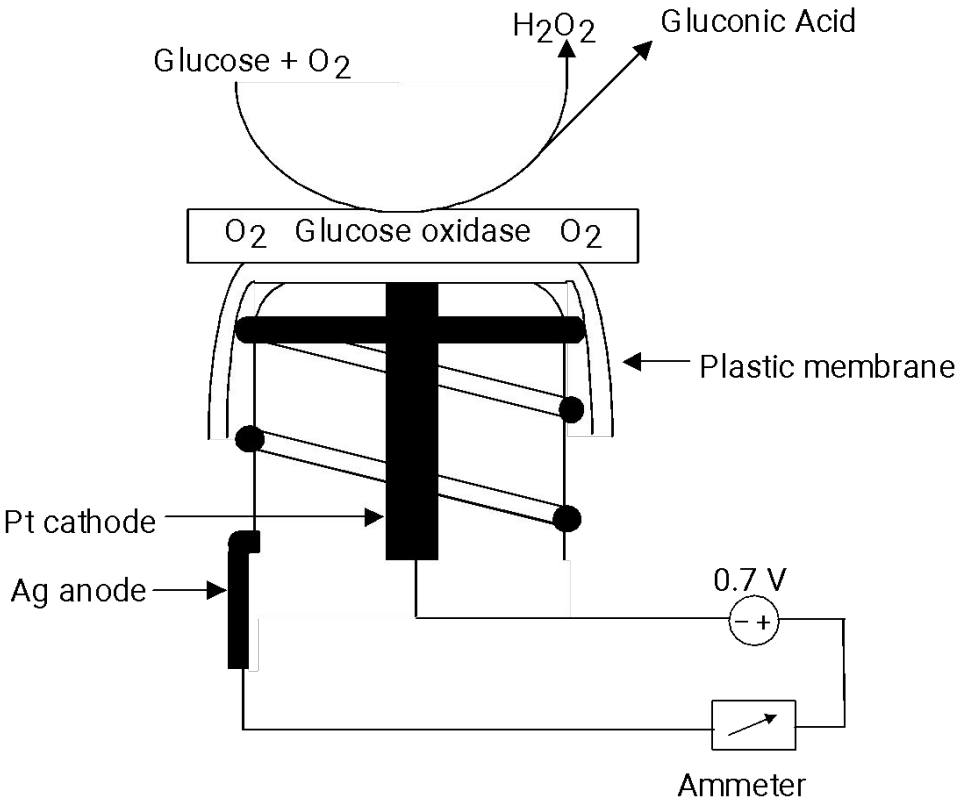


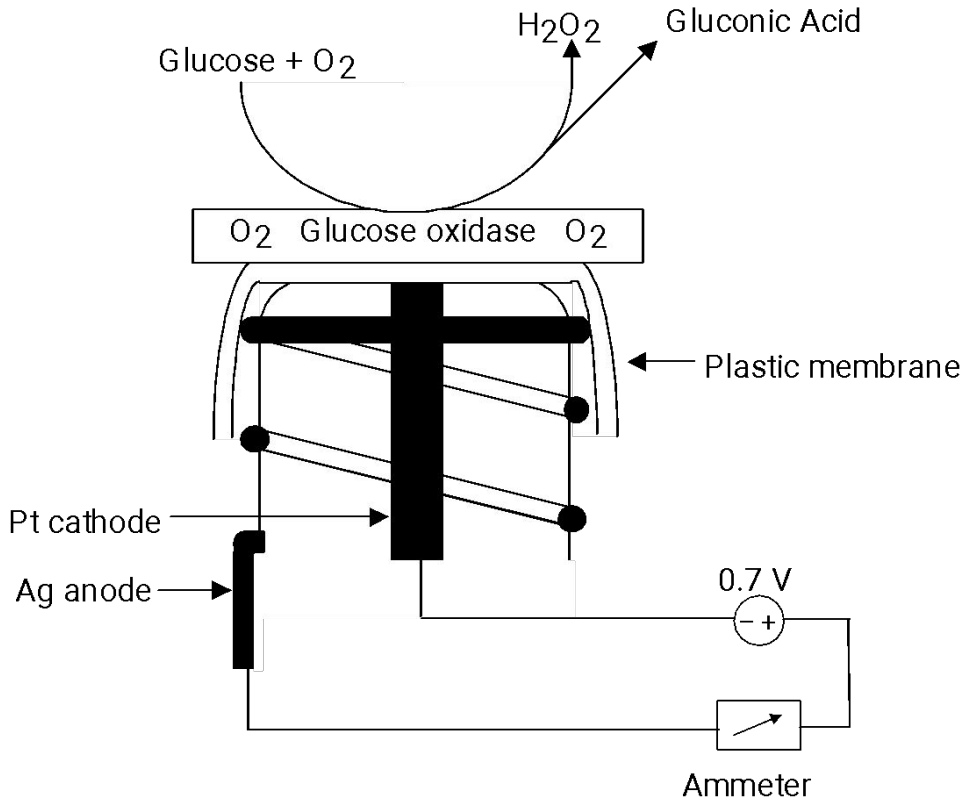


Максимум поглощения реакционной смеси – (реактив + глюкоза) находится в области 500 нм. Соответственно, изменение оптической плотности конечной реакции на длине волны 480-520 нм пропорционально концентрации глюкозы, содержащейся в пробе.

У ряда анализаторов глюкозы, работа основана на амперометрическом принципе измерения, при помощи специальных ферментных датчиков.

Перекись водорода является крайне нестабильным химическим соединением и она может служить **источником заряженных частиц**. Это и используется в ферментных датчиках мембранного типа или электрохимических элементах портативных глюкометров.





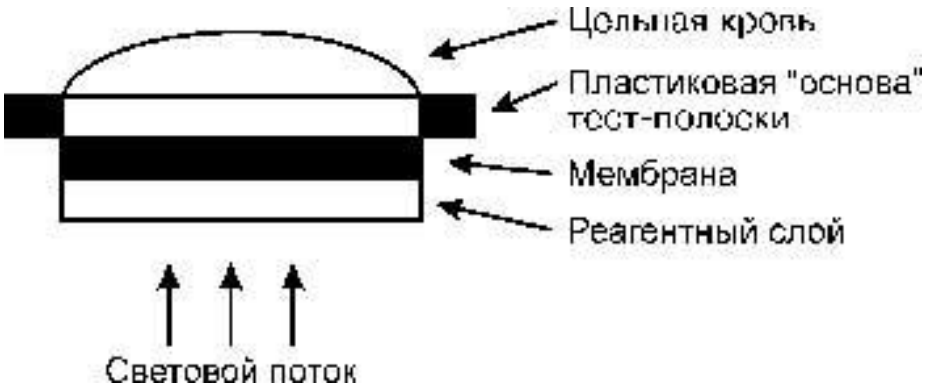
На мембрану толщиной около 60 микрон специальным образом сорбирована глюкозооксидаза. С другой стороны мембраны к ней прижимается платиновый электрод.

Глюкоза, подвергается окислению под воздействием фермента глюкозооксидазы, находящейся на мембране. Образовавшаяся перекись водорода диффундирует через мембрану и окисляется далее в каталитической реакции под действием платины. Диффузия перекиси водорода на поверхность платины формирует ток, пропорциональный числу молекул H_2O_2. Полученный таким образом сигнал обрабатывается прибором в соответствующее значение напряжения. Это измеренное значение пропорционально концентрации глюкозы в пробы.

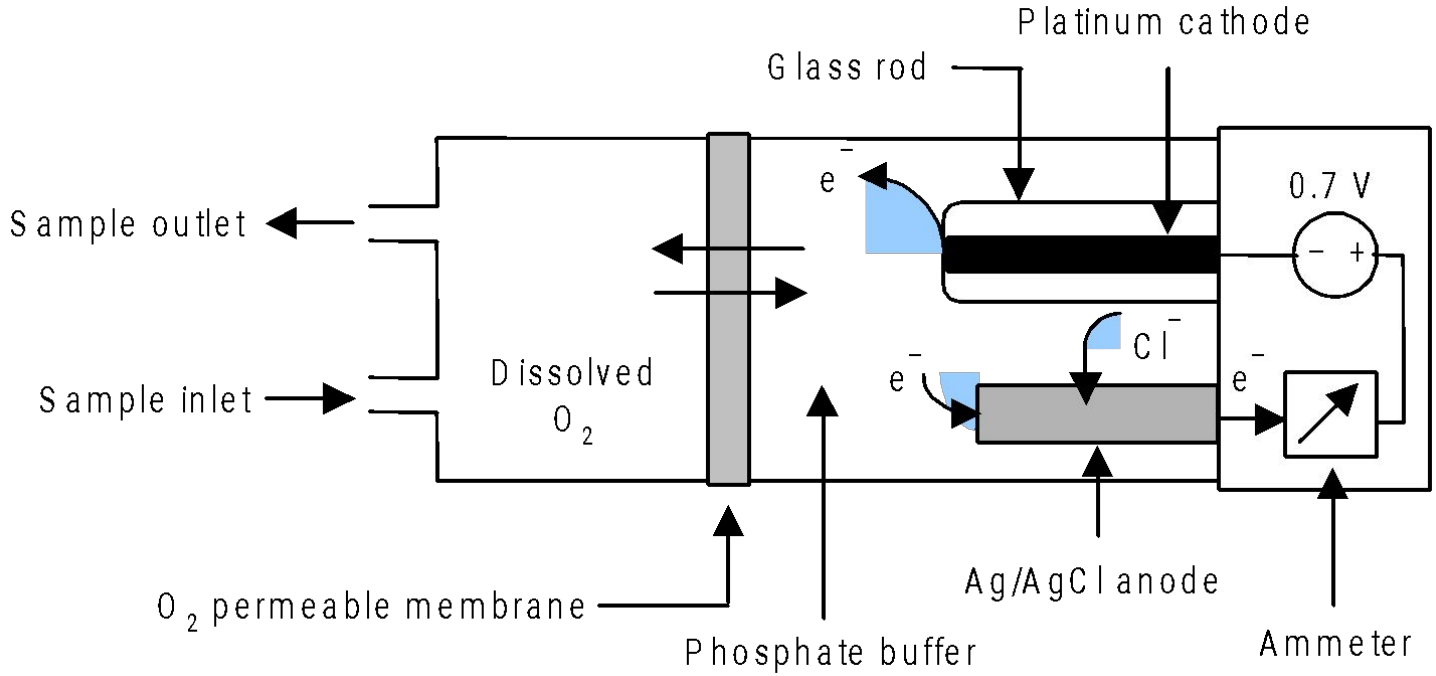
Методы «сухой химии»

Глюкометры **One Touch**

Тест-полоска One Touch содержит все необходимые химические компоненты для двухэтапного глюкозооксидазного метода, включая ферменты глюкозооксидазу и пероксидазу, которые сорбированы на пористую гидрофильную мембрану. Результатом реакции является образование окрашенного комплекса. Интенсивность развившейся окраски регистрируется отражательным минифотометром.



Amperometric blood oxygen sensor



Reaction at cathode:
oxygen is reduced

$$O_2 + 2H_2O + 4e^- \longrightarrow 2H_2O_2 + 4e^- \longrightarrow 4OH^-$$

$$4OH^- + 4KCl \longrightarrow 4KOH + 4Cl^-$$

Reaction at anode:

$$4Ag + 4Cl^- \longrightarrow 4AgCl + 4e^-$$

Analyte	Method of assay
Glucose	Amperometric biosensor
Urea	Potentiometric biosensor
Lactate	Amperometric biosensor
Hepatitis B	Chemiluminescent immunoassay
Candida albicans	Piezo-electric immunoassay
Cholesterol	Amperometric biosensor
Penicillins	Potentiometric biosensor
Sodium	Glass ion-selective electrode
Potassium	Ion-exchange-selective electrode
Calcium	Ionophore ion-selective electrode
Oxygen	Fluorescent quenching sensor
pH	Glass ion-selective electrode

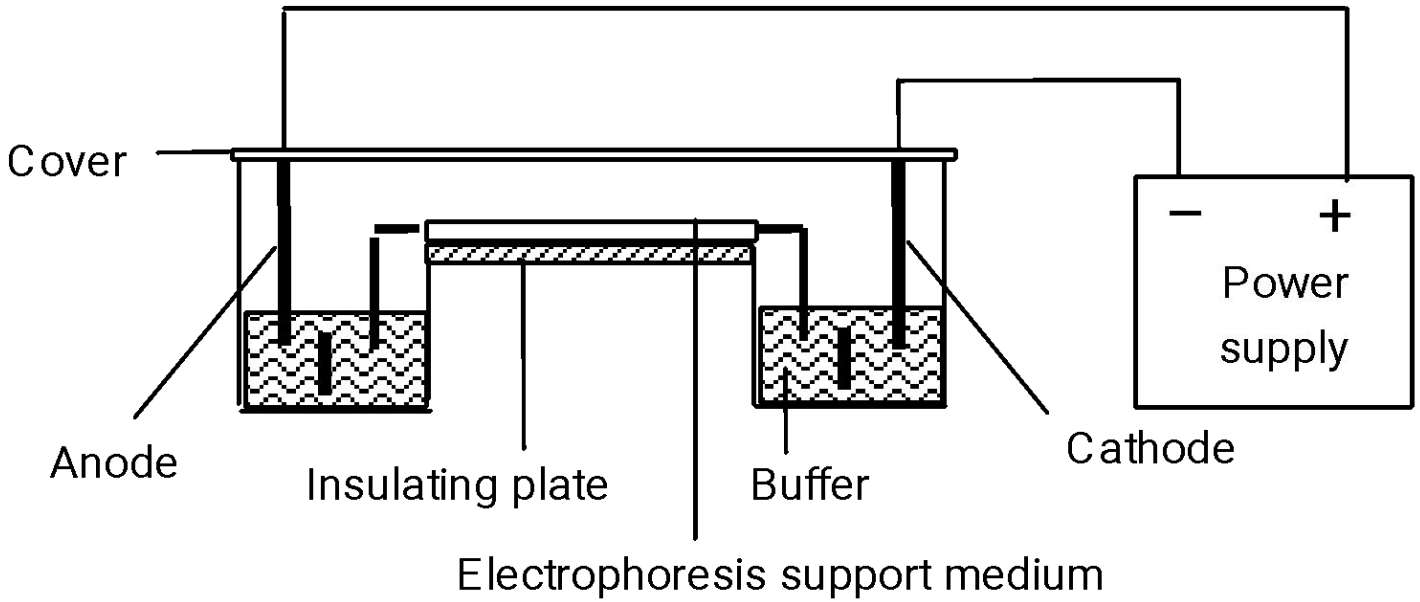
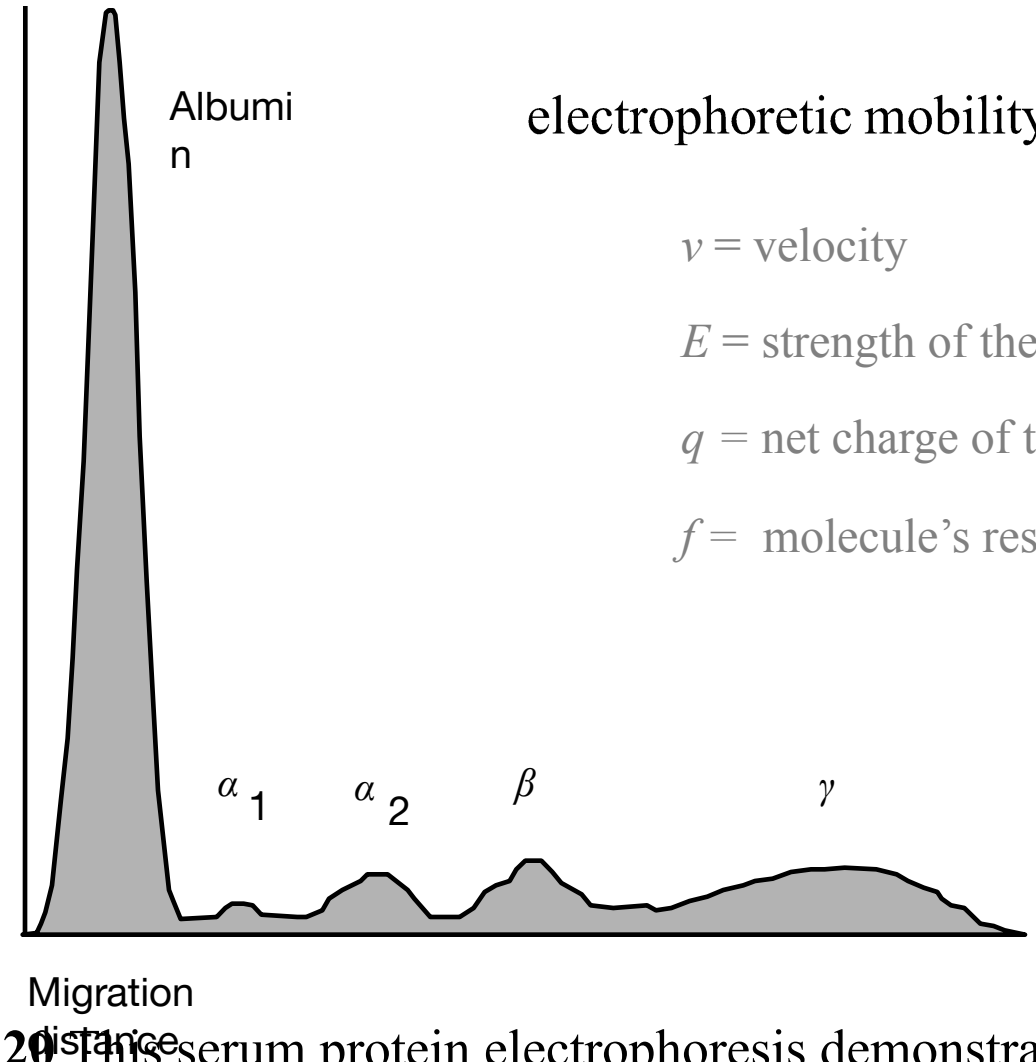


Figure 3.19 In an electrophoresis system, charged molecules move through a support medium because of forces exerted by an electric field.



electrophoretic mobility $\mu = \frac{v_{ss}}{E} = \frac{q}{f}$

v = velocity

E = strength of the electric field

q = net charge of the molecule

f = molecule's resistance

Figure 3.20 This serum protein electrophoresis demonstrates a normal pattern, with the largest peak for albumin.

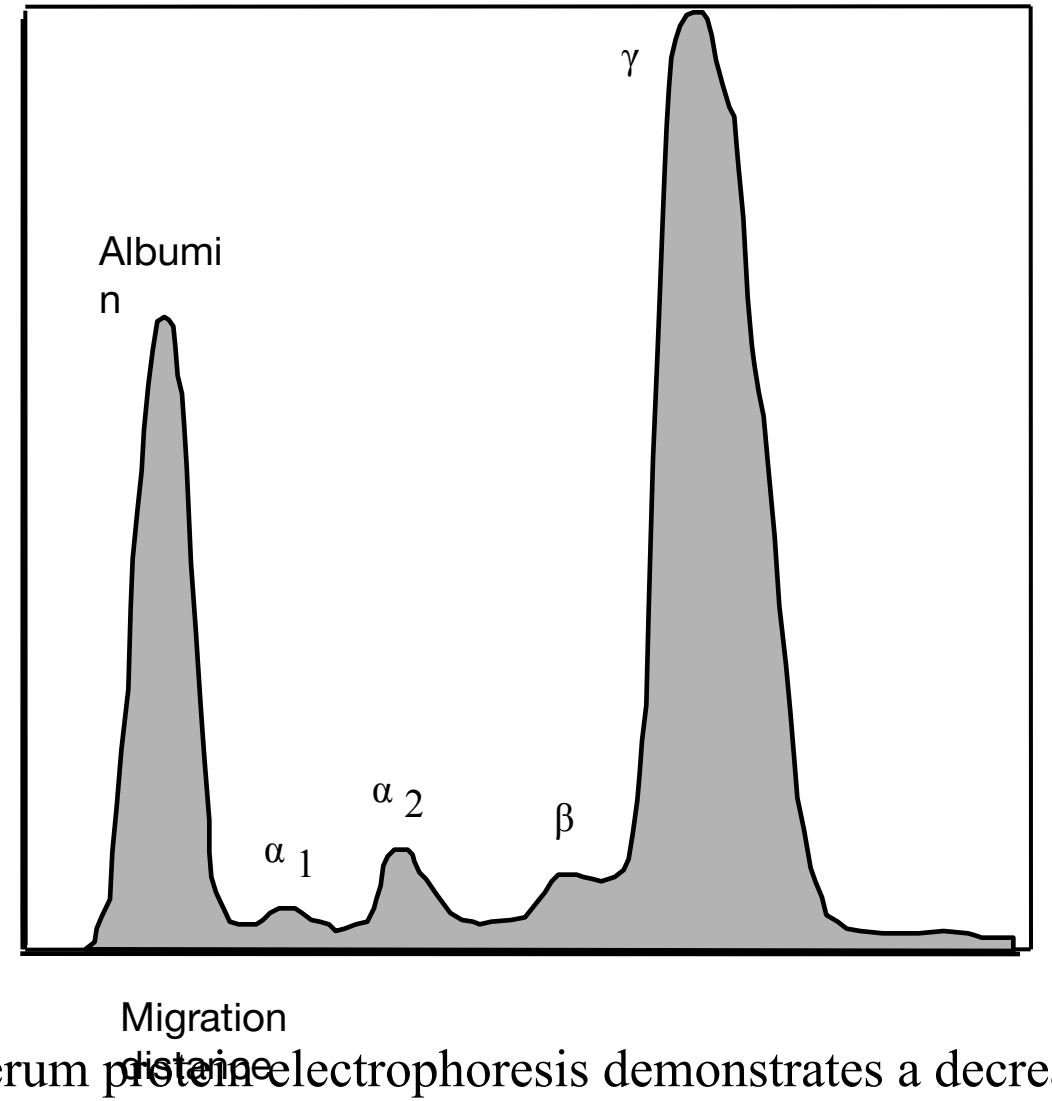
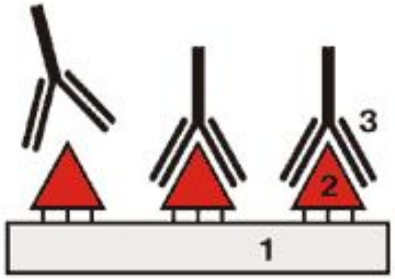
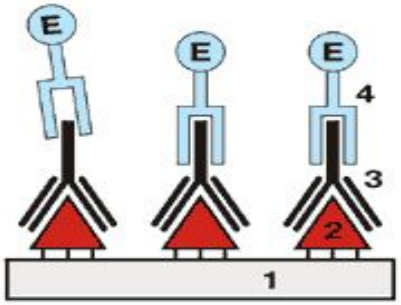


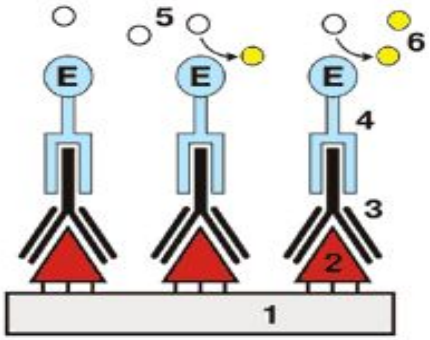
Figure 3.21 This serum protein electrophoresis demonstrates a decrease in the albumin and an increase in gamma globulins.

Иммуноферментный анализ

твердофазный иммуноферментный анализ





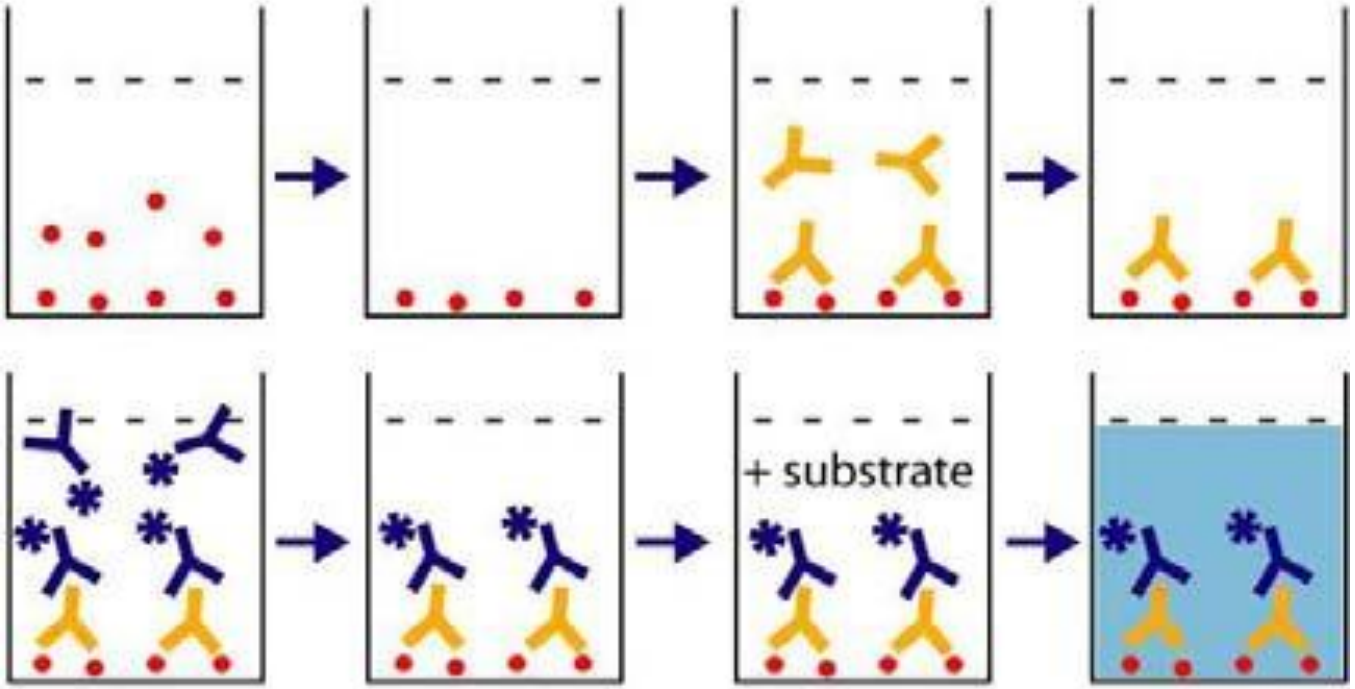


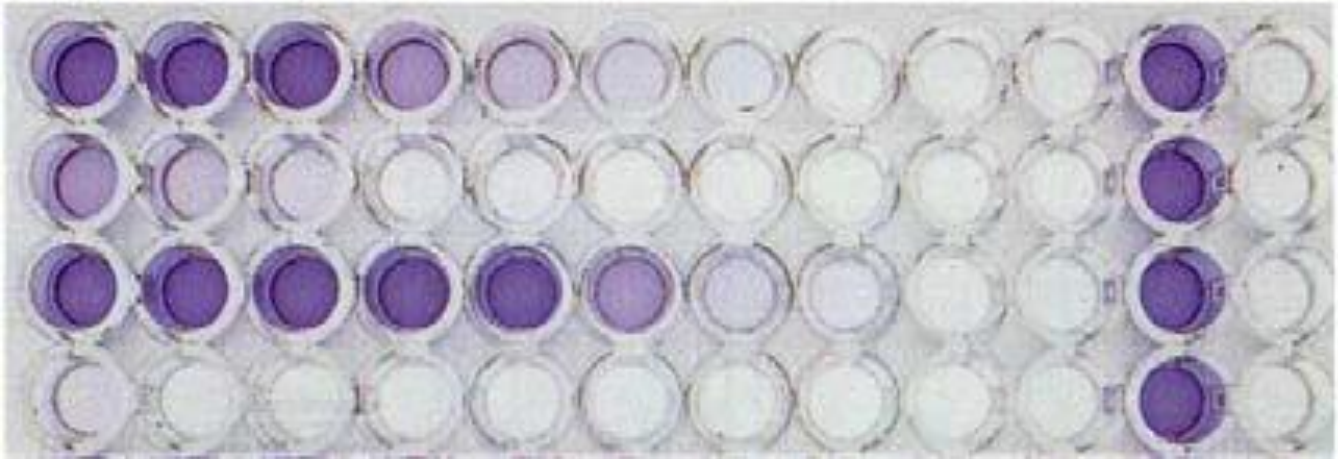
I. (2) Специфические антигены
(1) лунки планшета
(3) антитела (эти антитела называются первыми)
(2/3)связь антиген/антитело

II. (4) вторые антитела
(E) активный фермент
(2\3\4)структура типа "сэндвич"

III. (5) бесцветный субстрат
(6) окрашенный продукт

IV. Количество окрашенного продукта измеряется на фотометре при определенной длине волны


+ substrate



Оборудование для иммуноферментного анализа

Инкубатор - шейкер

StatFax 2200

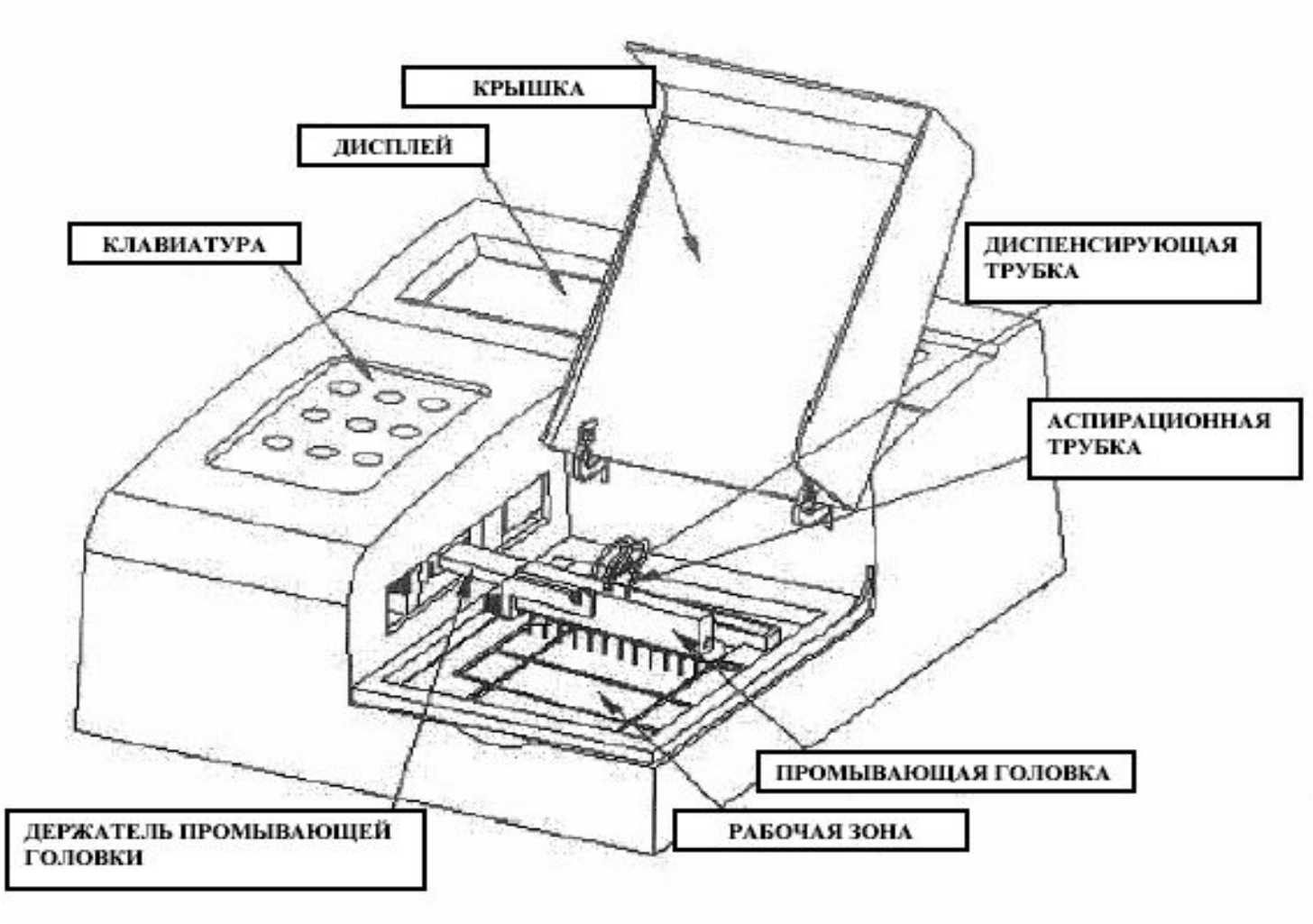
Мойка для ИФА-иммунопланшетов

StatFax 2600

Микропланшетный автоматический фотометр Stat Fax 2100

Производитель: Awareness Tehnology, США

Составляющие иммуноферментного анализатора



ELISA microplate reader

Hidex Chameleon microplate reader

Позволяет измерять:

- **Оптическую плотность**
- **Люминесценцию**
- **Флуоресценцию**
- **Жидкостную сцинтилляцию**

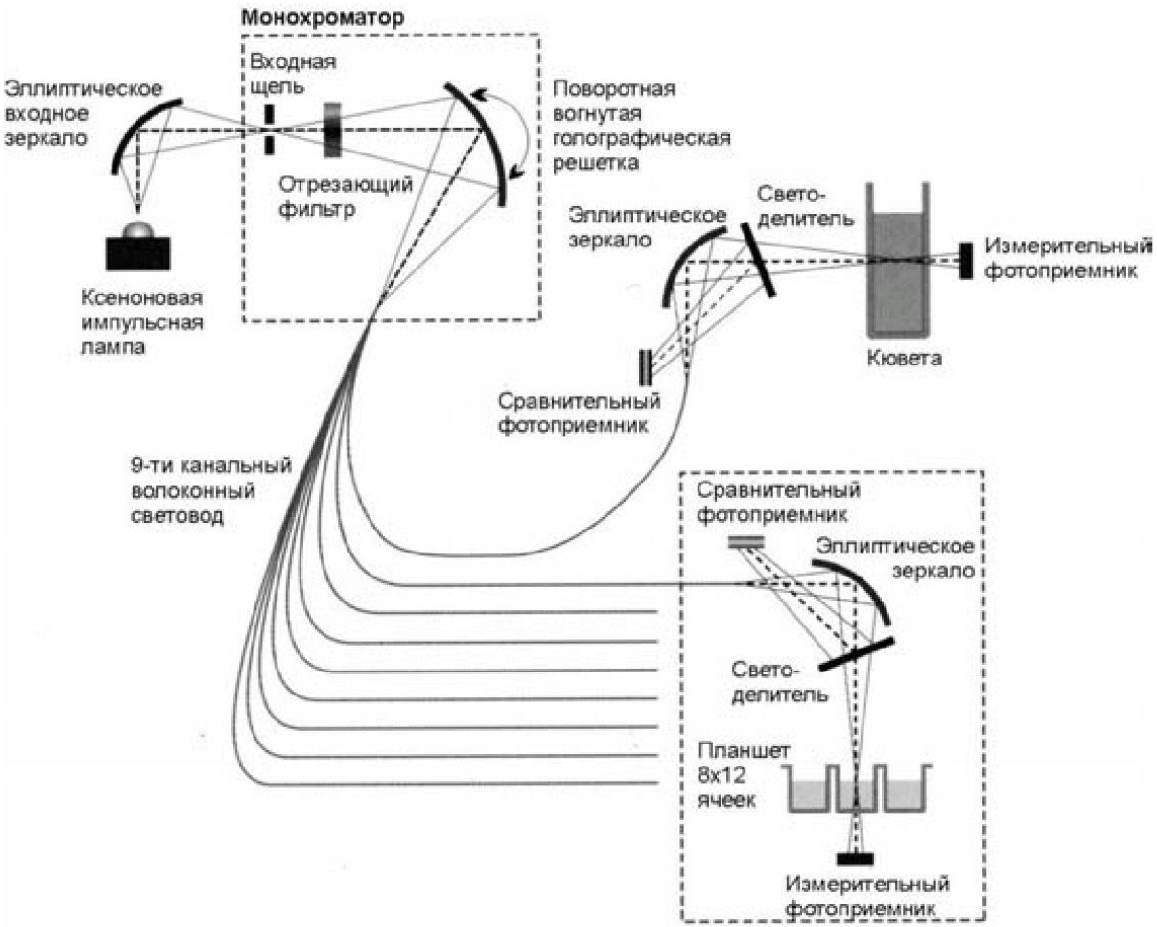


Рис. 114. **Волоконный световод** минимизирует оптическую схему планшетного фотометра SPECTRAmax PLUS

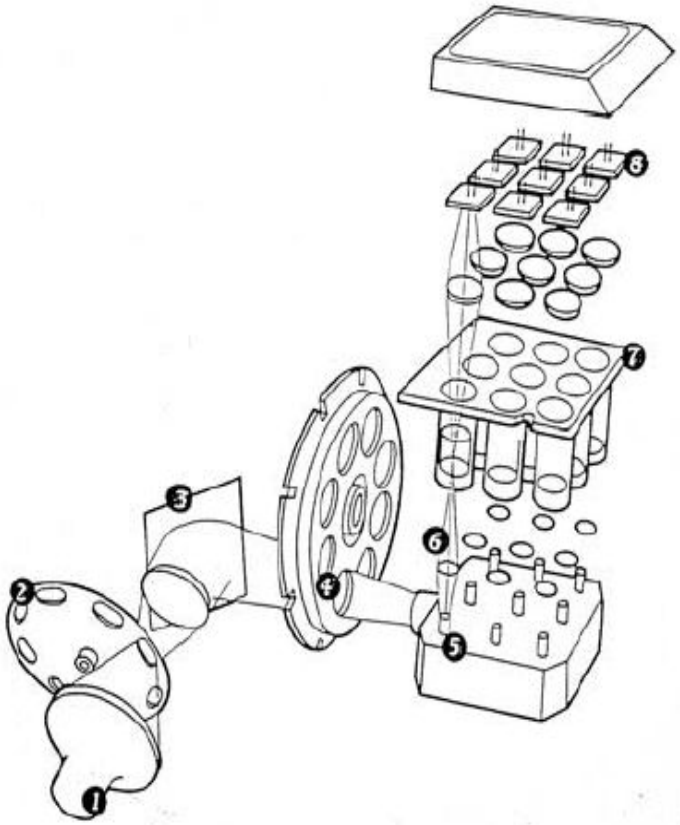


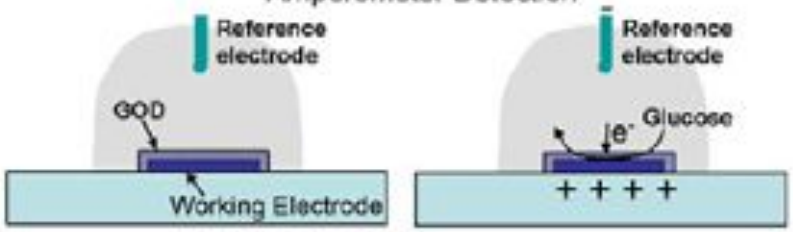
Рисунок 123. Оптическая схема девяти канального анализатора FP-901.

1 – галогеновая лампа; 2 – обтюратор (прерыватель света – вращающийся диск с отверстиями); 3 – поворотное зеркало; 4 – турель с узкополосными интерференционными фильтрами; 5 – оптико-волоконнный разветвитель света на 9 каналов; 6 – 9 коллимирующих линз; 7 – 9-ти луночный планшет; 8 – кремниевые фотодиоды.

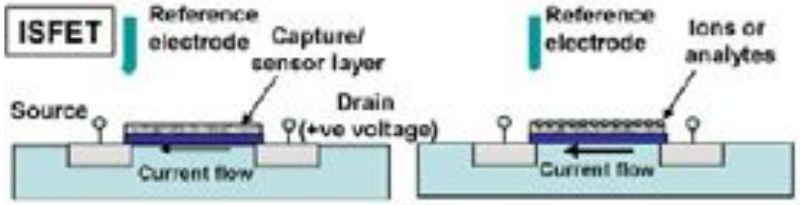
Electrical Detection

Conductometric Detection

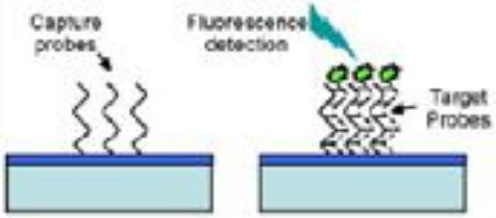
Amperometer Detection



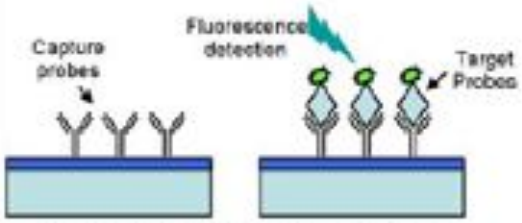
Potentiometric Detection



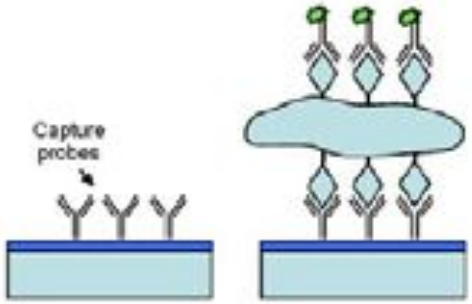
Optical Detection



DNA detection on chip surfaces



Protein detection on chip surfaces



Cell detection on chip surfaces

КОАГУЛОМЕТРЫ

В настоящее время для диагностики нарушений гемостаза все большее распространение приобретают приборы, автоматически регистрирующие время образования **сгустка фибрина** в тестируемой смеси.

Эти приборы называют коагулометрами, они заметно облегчают труд лаборанта, устраняют элементы субъективности при выполнении коагуляционных тестов в клинико-диагностической лаборатории. При этом производители предлагают достаточно много конструктивных вариантов коагулометров.

Классификация коагулометров

По принципу регистрации образования сгустка фибрина

По числу регистрирующих каналов коагулометра

По уровню автоматизации

Принципы регистрации образования сгустка фибрина

- Оптический
- Механический
- Оптико-механический

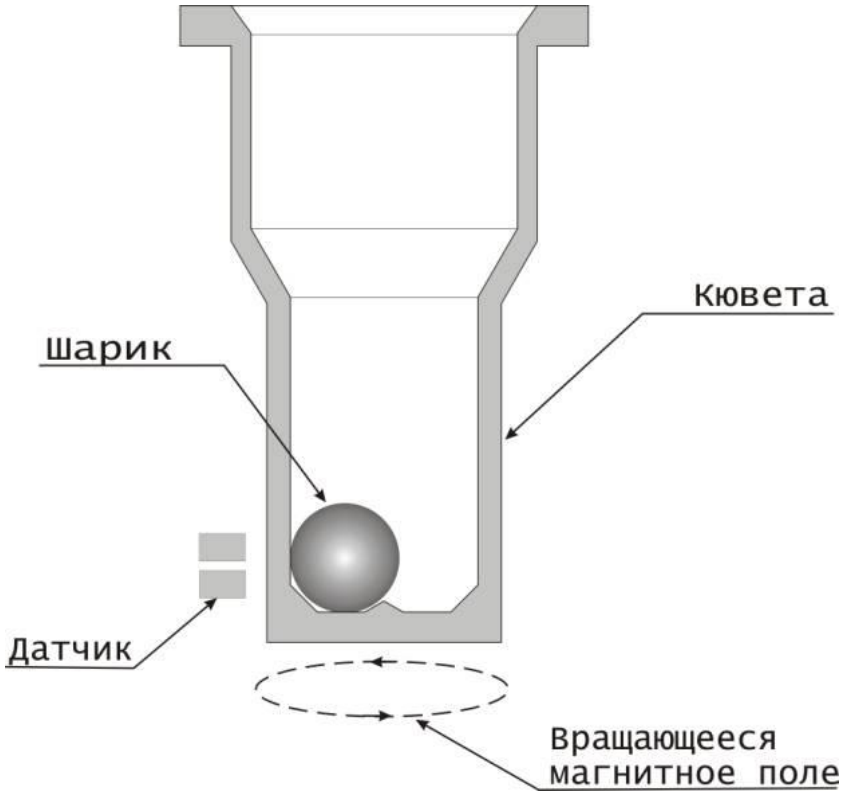
Оптический метод позволяет более надежно регистрировать момент быстрого образования фибриновых нитей и при относительно низких концентрациях фибриногена, когда консолидированного сгустка не образуется. Однако в этот момент наступает просветление смеси – увеличение светопропускания, которое и фиксируется оптоэлектронной системой (сигнал, снятый самописцем с фотодатчика, изображён на рисунке).

Оптический метод регистрации фибринового сгустка

Этот метод основан на том, что исходная плазма с добавленными в нее реагентами достаточно прозрачна, а при формировании в ней фибриновых нитей возникает довольно сильное рассеивание света (помутнение смеси). Уменьшение светопропускания фиксируется оптоэлектронным датчиком(сигнал, снятый самописцем с датчика, изображён на рисунке). Так происходит, если образуется достаточно мощный сгусток.

Механический метод регистрации фибринового сгустка

Метод основан на определении момента быстрого увеличения вязкости плазмы. В измерительную кювету помещается металлический шарик. Внутри кюветы создается так называемое вращающееся магнитное поле, которое заставляет шарик вращаться со строго фиксированной скоростью. Сила поля отрегулирована так, чтобы в плазме шарик устойчиво вращался, а при формировании фибринового сгустка определённой плотности – останавливался.



За вращением шарика следит оптоэлектронная система, которая устроена следующим образом. Луч светодиода направлен на измерительную кювету. Когда шарик при вращении попадает в луч, блик отражения от него попадает на фотоприёмник. Поступление с фотоприёмника импульсного сигнала означает, что шарик вращается. При его остановке сигнал пропадает, и электронный секундомер автоматически останавливается.

В представленной таблице показано оптимальное число регистрирующих каналов коагулометра без автоматических функций в зависимости от числа коагуляционных тестов, выполняемых в течение рабочего дня в клинико-диагностической лаборатории.

Число каналов коагулометра	**Примерное число коагуляционных тестов, выполняемое в клинической лаборатории в течение рабочего дня**
Одноканальный	до 30
Двухканальный	30-79
Четырёхканальный	80-300
Десятиканальный/автоматический	более 300

Автоматизация регистрации сгустка в тестируемой смеси коагулометром

- Автоматические
- Полуавтоматические
- Коагулометры без автоматических функций с программируемым модулем вычислений
- Коагуляторы

Автоматические коагулометры

Автоматическим коагулометром следует называть коагулометр с высокой производительностью, в котором предусмотрена программа, полностью контролирующая добавление реагентов, (и позволяющая изменять объемы дозируемых реагентов), а также автоматическую подачу образцов плазмы для исследования, наличие программируемого алгоритма, позволяющего выполнять разные тесты для разных образцов плазмы, автоматическую регистрацию и запоминание результатов исследования, с возможностью последующей обработки этих результатов.

Полуавтоматические коагулометры

Полуавтоматическими следует называть коагулометры, имеющие программируемый модуль, позволяющий автоматически добавлять реагенты в кювету для регистрации коагуляции (но не позволяющий добавлять исследуемую плазму в кювету). Кроме того, такие коагулометры имеют автоматическую регистрацию и запоминание результатов исследования, с возможностью обработки результатов.

Коагулометры без автоматических функций,с программируемым модулем вычислений

Это наиболее распространенный вариант. Такой коагулометр имеет программируемый модуль для выполнения вычислений и возможность хранения в памяти коагулометра калибровочных кривых (что весьма значимо для определения уровня фибриногена).

Коагуляторы

Коагулятором следует назвать примитивный коагулометр, позволяющий определить только время свертывания.

Коагулятор не имеет программируемого модуля для выполнения вычислений, поэтому не предусмотрена возможность хранения какой-либо информации, в том числе нет возможности хранения калибровочных кривых, нет модуля распечатки результатов, нет возможности кого-либо расчета, поэтому коагуляторы способны представить результаты исследования только в секундах.

Основные тесты выполняемые с использованием коагулометров

- Протромбиновое время (Протромбиновый тест (МНО, ПО, ПТИ) и протромбин по Квику)
- Фибриноген
- Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ)
- Тромбиновое время
- Время свёртывания

Протромбиновый тест (МНО, ПО, ПТИ)

Используемые реактивы:

Для работы используются реактивы для определения протромбинового времени, например:

НПО «Ренам»:

- Тромбопластин с кальцием (МИЧ=1,1 – 1,5);
- Диагем П;
- Ренам-пластин.

Фирма «Технология-Стандарт»:

- Техпластин-тест (МИЧ 1,1 – 1,2);
- Техпластин-тест(К) с МИЧ 1,1-1,2 (для капиллярной крови).

Общие направления развития клинической лабораторной диагностики

1. Развитие компьютерных технологий.
2. Распространение и расширение диагностических возможностей относительно новых методов лабораторной диагностики.
3. Сокращение в лабораторной практике сложных исследований.
4. Ускорение цикла лабораторного обследования пациентов.
5. Централизация лабораторных исследований.
6. Специализация лабораторных исследований.
7. Приближение лабораторной диагностики к пациенту.
8. Управление качеством клинических лабораторных исследований.
9. Стандартизация лабораторных исследований.