

Запорізький державний медичний університет

Кафедра клінічної лабораторної діагностики



Основні аналітичні технології та оснащення сучасної клінічної лабораторії.

Біохімічні методи.

Біохімічні методи дослідження в КДЛ



Приладова діагностика

В клінічній лабораторній діагностиці широке застосування знайшли **фотометричні методи** кількісного аналізу, засновані на переведенні компонентів які визначаються в поглиначі світло з'єднання з подальшим визначенням їх кількості шляхом вимірювання світлопоглинання розчинів.

Кращими методами для визначення гемоглобіну, наприклад, є **гемиглобінціанідний та геміхромний**, що забезпечують надійність і високу точність кількісного визначення вмісту гемоглобіну в крові.

Типи приладових методів

Фотометрія – сукупність оптичних методів і засобів вимірювання фотометричних величин світлового потоку. Основним поняттям фотометрії є потік випромінювання, сенс якого в потужності електромагнітного (оптичного) випромінювання, що переноситься.

Спектрофотометрія - визначення залежності фотометричних величин від довжини хвилі випромінювання.

Спектроскопія або емісійний спектральний аналіз - визначення випромінювальної здатності речовин в залежності від довжини хвилі випромінювання.

Колориметрія - вимірювання без виділення вузького діапазону довжин хвиль, тобто вимірюються характеристики всього світлового потоку.

Прилади, що реєструють поглинання світла речовиною - *фотометри*, реєструючі відображення – *відображувальні фотометри*.

Фотометричні методи застосовуються також у тих випадках, коли вивчається здатність речовин розсіювати (*нефелометрія*) і пропускати випромінювання (*турбидиметрія*), перевипромінювати поглинуте випромінювання (*флуориметрія*), змінювати ступінь поляризації випромінювання при проходженні його через оптично активні речовини (*поляриметрія*).

Рефрактометрія вивчає показники заломлення оптичного випромінювання твердих, рідких і газоподібних речовин в залежності від довжини хвилі випромінювання.

Потенціометрія об'єднує методи, засновані на вимірюванні едс оборотніх електрохімічних ланцюгів, коли потенціал робочого електрода близький до рівноважного значення. Потенціометрія включає редоксиметрію, іонометрію та потенціометричне титрування.

Квантові характеристики світла

Світло випускається і поглинається речовиною у вигляді суворо певних порцій енергії - світлових квантів - **фотонів**.

Лінії, уздовж яких розповсюджується світлова енергія, називаються **променями**.

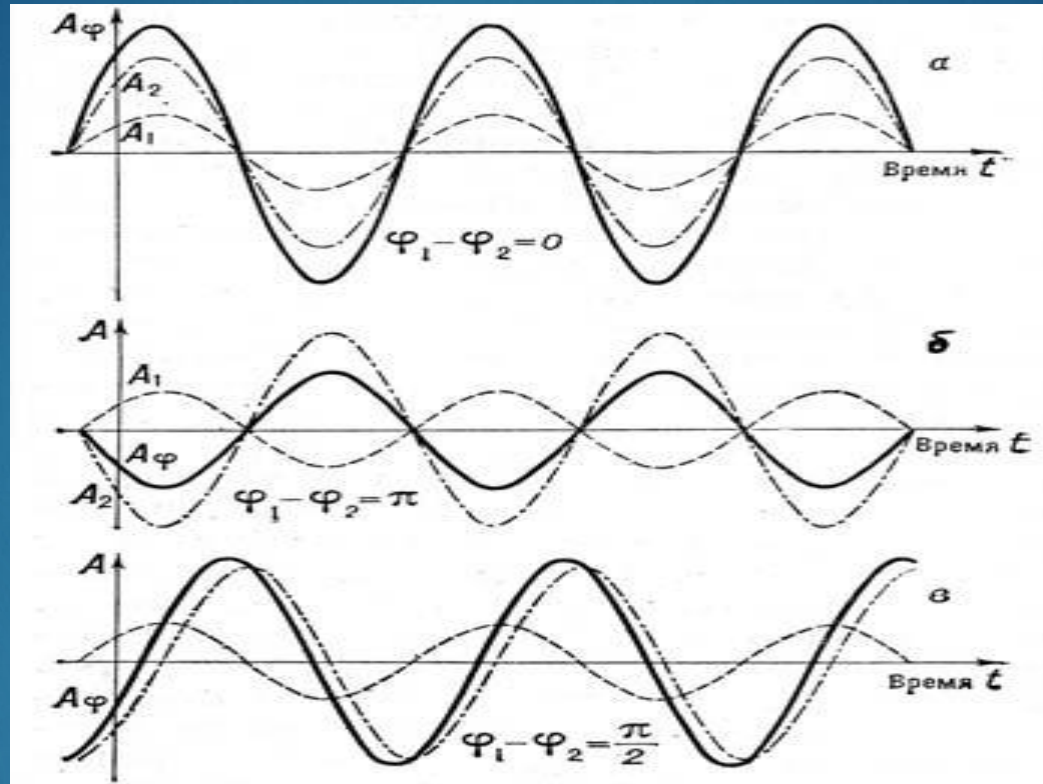
Світло, в якому напрямки коливань упорядковані яким-небудь чином, називається **поляризованим**.

Основною хвильовою характеристикою світла є довжина **хвилі λ** , що виражається в нм, мкм, або см.

Оптичне випромінювання якої-небудь однієї довжини хвилі являє собою **монохроматичне випромінювання**.

Когерентність – це узгоджене протікання в часі та просторі декількох коливальних або хвильових процесів, що проявляється при їх складанні. Коливання називаються когерентними, якщо різниця їх фаз залишається постійною в часі, додавання коливань визначає амплітуду сумарного коливання

Хвильова теорія світла



Додавання коливань двох світлових хвиль (пунктир) з амплітудами A_1 і A_2 при різних фазах. Результуюче коливання – суцільна лінія.

Нефелометрія

- ▶ **Нефелометрія** заснована на феномені розсіювання світла, коли падаючий промінь вдаряється в частку або комплекс антиген — антитіло в розчині. В результаті цього кількість розсіяного світла пропорційно кількості антигену.
- ▶ Нефелометрію зазвичай використовують для визначення рівня специфічних білків, які, зв'язуючись з антитілами, утворюють хрестоподібні частки в розчині.
- ▶ Під нефелометри зазвичай спеціалізовані окремі аналізатори, які мають обмежене меню тестів, оскільки принцип розсіювання світла застосовується тільки для молекул розміром не більше 40 нм.

► Нефелометрія-вимірювання розсіяного світла. Якщо відомі розміри частинок , то інтенсивність розсіяного світла при **фіксованому куті** вимірювання буде пропорційна концентрації речовини. Прилади для нефелометрії програмуються під вимірювання певних компонентів біологічної рідини.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕЦИФІЧНИХ БІЛКІВ

ИДЦ

*АВТОМАТИЧНИЙ
НЕФЕЛОМЕТР «BNProSpec»-*




Переваги автоматичної нефелометрії

- + ОДИНОЧНИЙ АНАЛІЗ
- + ВИСОКА СТАБІЛЬНІСТЬ РЕАГЕНТІВ
- + ВИСОКА СПЕЦИФІЧНІСТЬ (ОСОБЛИВО ВАЖЛИВО БЛИЗЬКО «НУЛЯ»), НЕМАЄ ПОМИЛКОВИХ ЗНАЧЕНЬ
- + ВИСОКИЙ ДИНАМІЧНИЙ ДІАПАЗОН

Спектр тестів автоматичного нефелометра

α1-мікроглобулін	β2-мікроглобулін	α2-макроглобулін	Альбумін	Загальний білок
Фібронектін	Цістатін С	Легкі ланцюги 'λ'	Легкі ланцюги 'κ'	Вільні легкі ланцюги
ASLO, RF, CRP sen	Церулоплазмін	α1-Глікопротеїн	α1-антитрипсин	ADNase, SAA
Гаптоглобін	Ретинол вільний білок	Преальбумін	Трансферин	Міоглобін
APO A-I	APO-B	APO-E	LP(a)	APO A-II
IgG, IgE	IgA, IgM	IgG1, IgG2	IgG3, IgG4	ЦІК
C3c, C4	C1-інгібітор	Плазміноген	Фібриноген	Антитромбін-III
Гемопексин	Р-н. трансф. рец.	Трансферин, CDT	Феритин	Гомоцистеїн



► Турбідиметрія - вимір світла, що пройшло за законом Бугера - Ламберта (18 століття). Як турбідиметр можна використовувати більшість фотометрів та біохімічних аналізаторів.



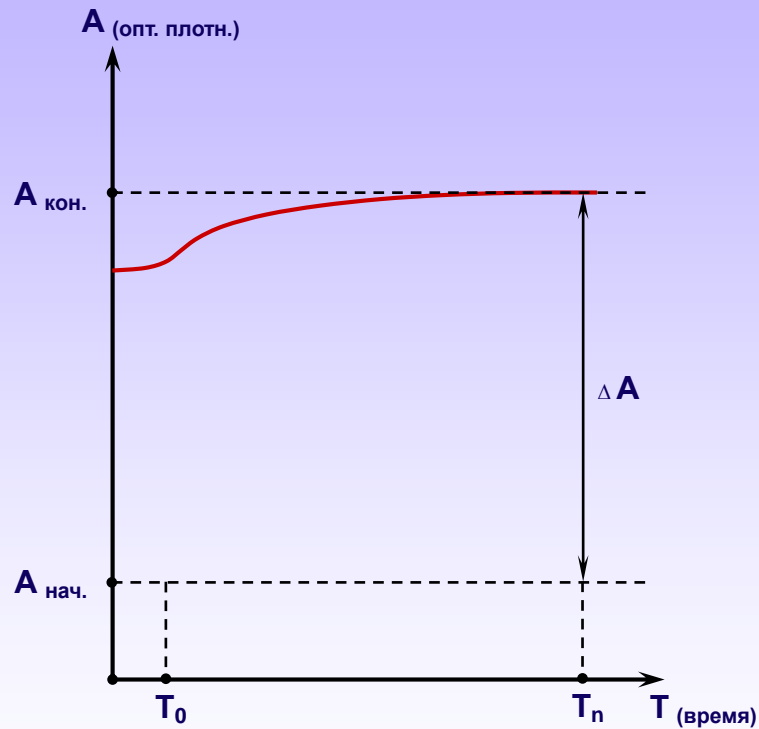
Фотометрія
В
сучасній лабораторії

Вимірювання по «кінцевій точці»



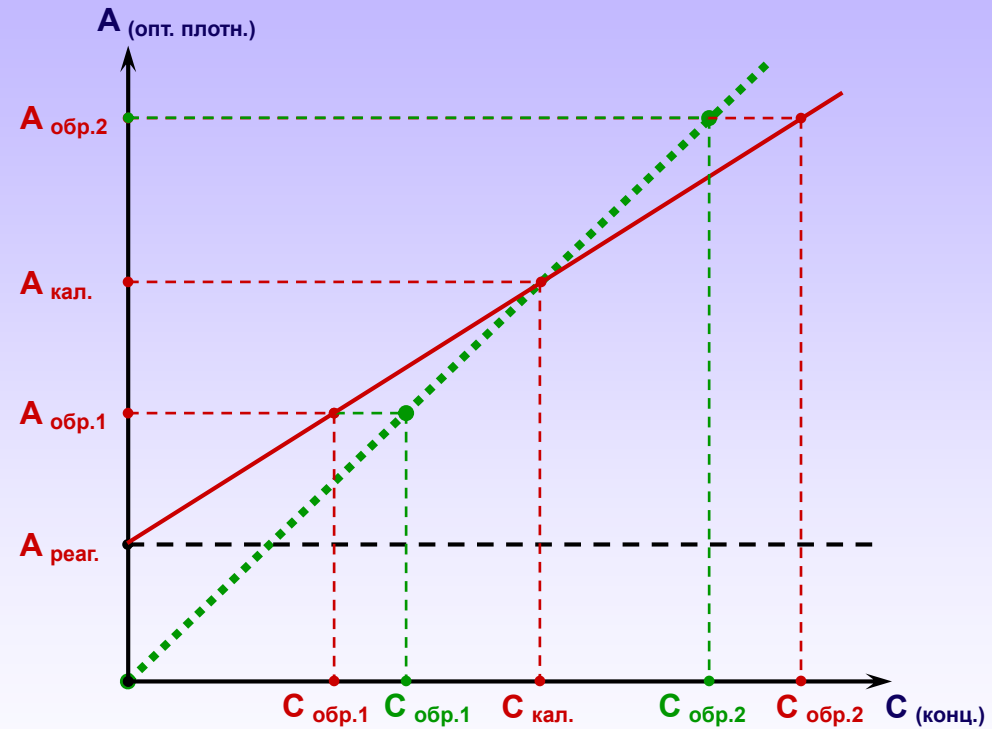
Крива реакції

(зміна оптичної щільності в залежності від часу)



Калібрувальний графік

(залежність оптичної щільності від концентрації)



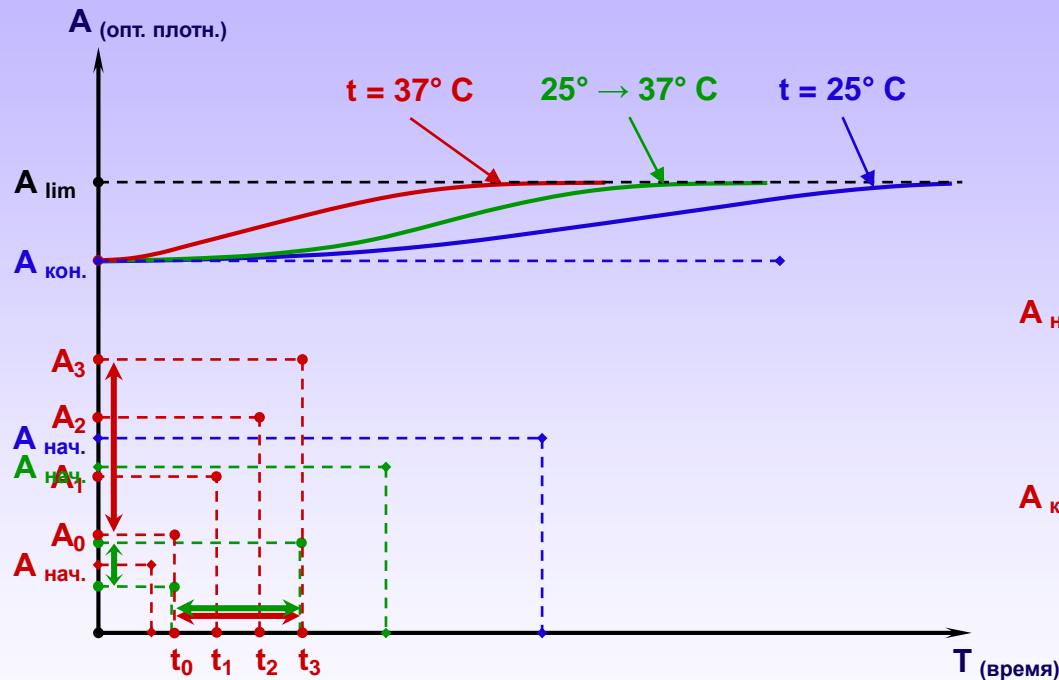
$$C_{\text{обр.}} = \frac{A_{\text{обр.}} - A_{\text{реар.}}}{A_{\text{кал.}} - A_{\text{реар.}}} \times C_{\text{кал.}}$$

Кінетичні вимірювання



Крива реакції

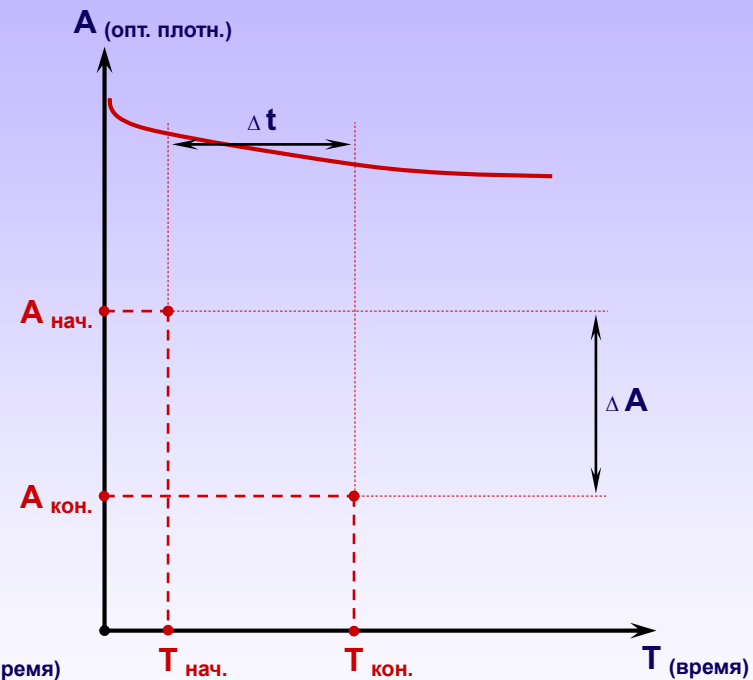
(збільшення оптичної щільності в залежності від часу)



$$C_{\text{обр.}} = \frac{(A_1 - A_0) + (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2)}{t_3 - t_0} \times F$$

Крива реакції

(зменшення оптичної щільності в залежності від часу)

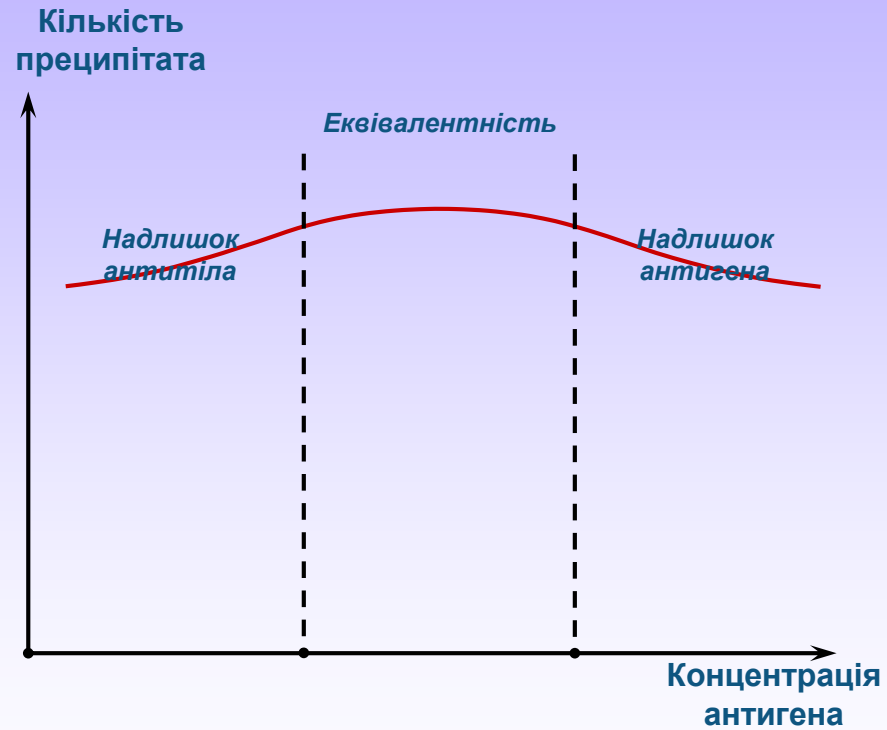


Нелінійне багатоточкове калібрування



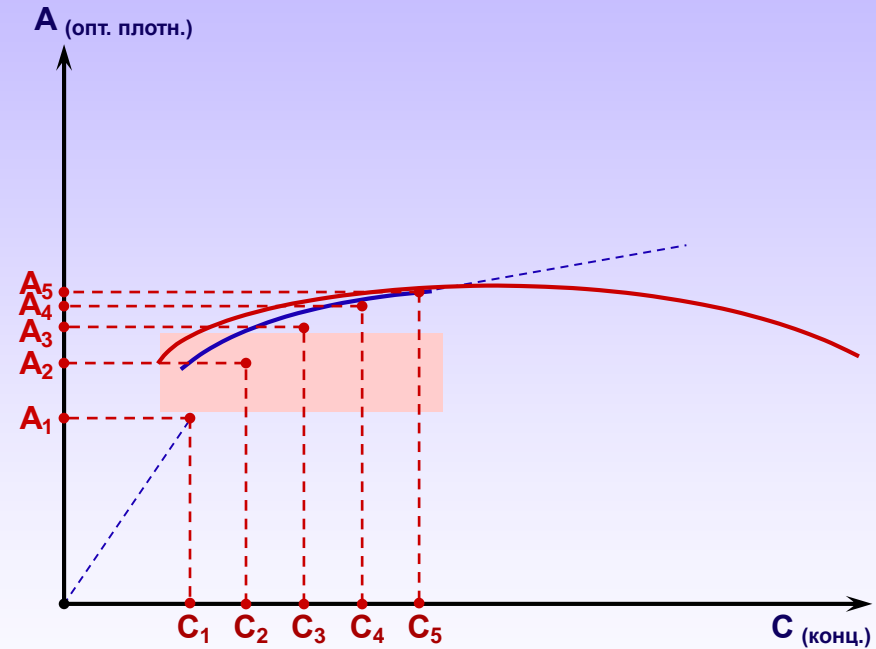
Крива реакції

(зміна оптичної щільності в залежності від часу)



Калібрувальний графік

(залежність оптичної щільності від концентрації)



Що ж таке сучасний фотометр?



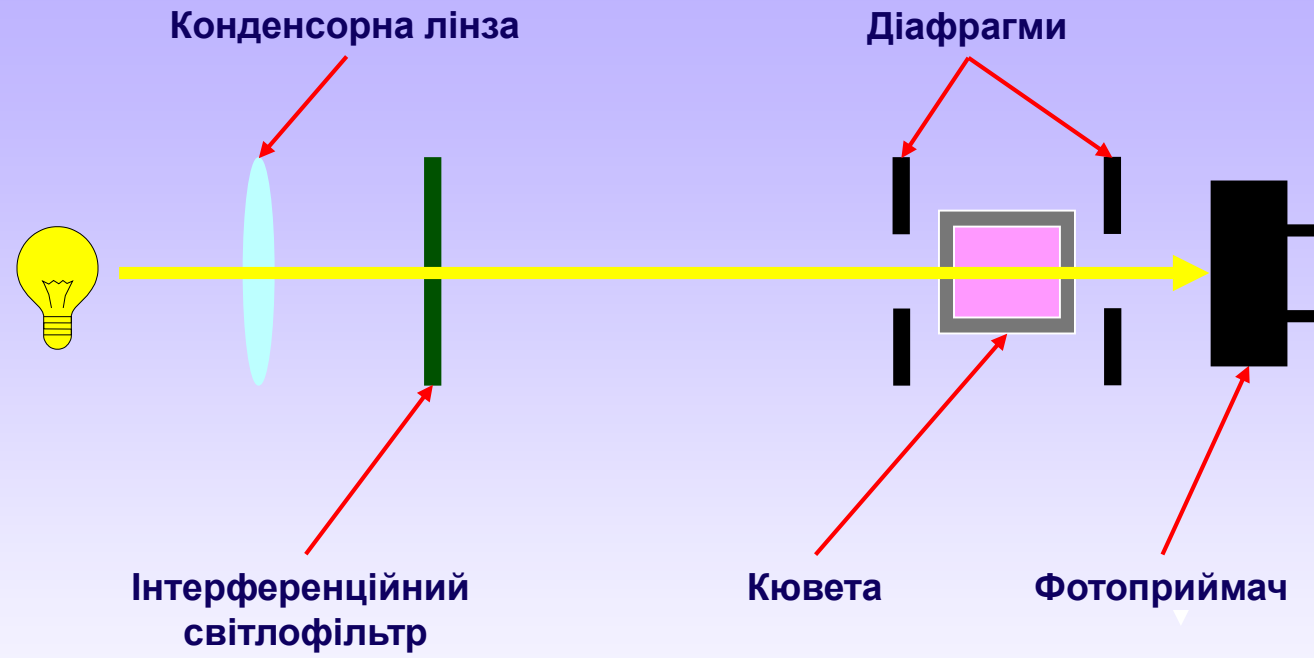
Вимоги



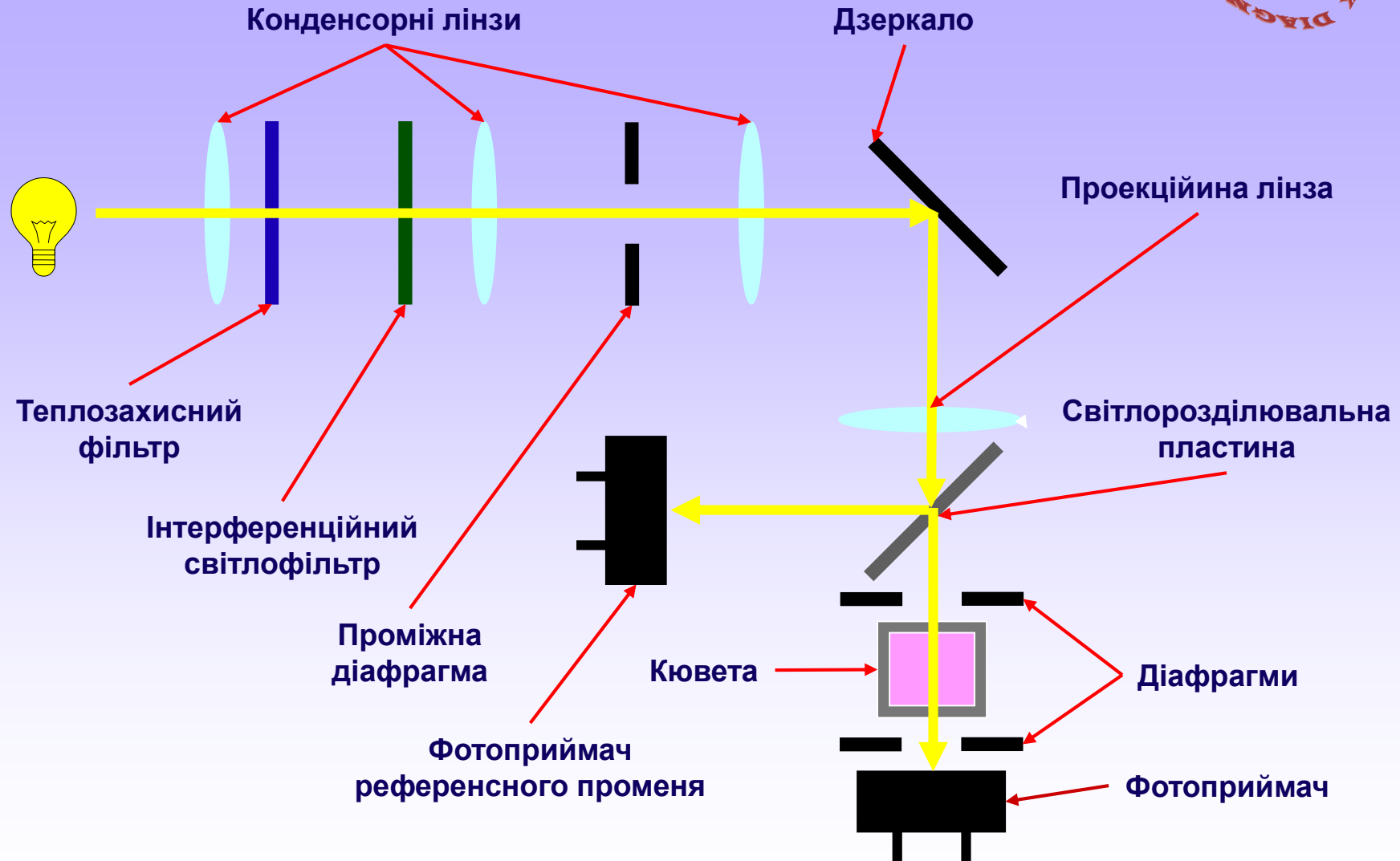
які пред'являються до сучасного фотометру:

- Низька вартість.
- Простота експлуатації і зручний інтерфейс.
- Можливість програмування.
- Можливість кінетичних вимірювань.
- Невеликий об'єм реакційної кювети.
- Сумісність з комп'ютером.
- Гарантійне та післягарантійне обслуговування.
- Наявність або можливість підключення проточної кювети.
- Висока точність вимірювань.

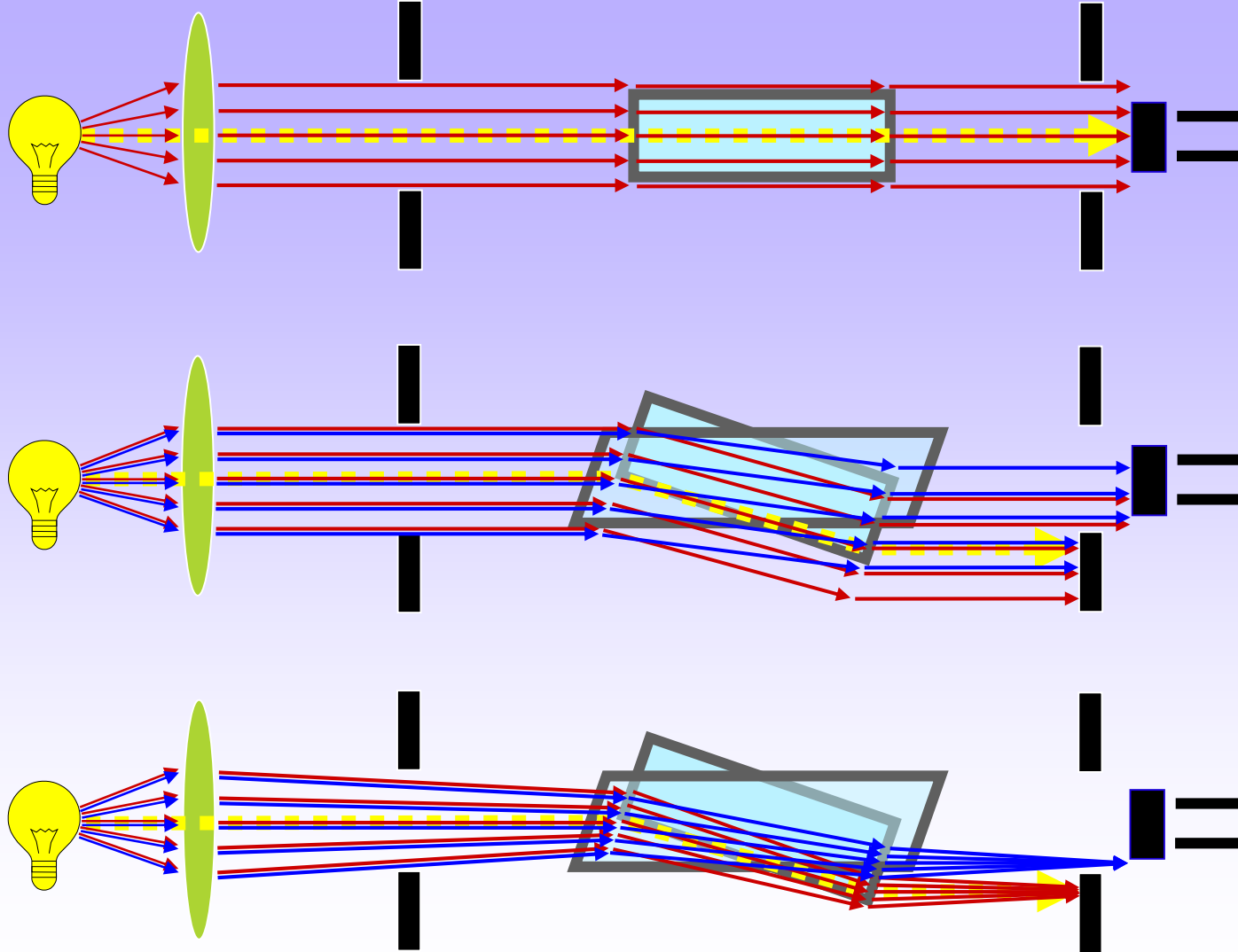
Спрощена оптична схема фотометра



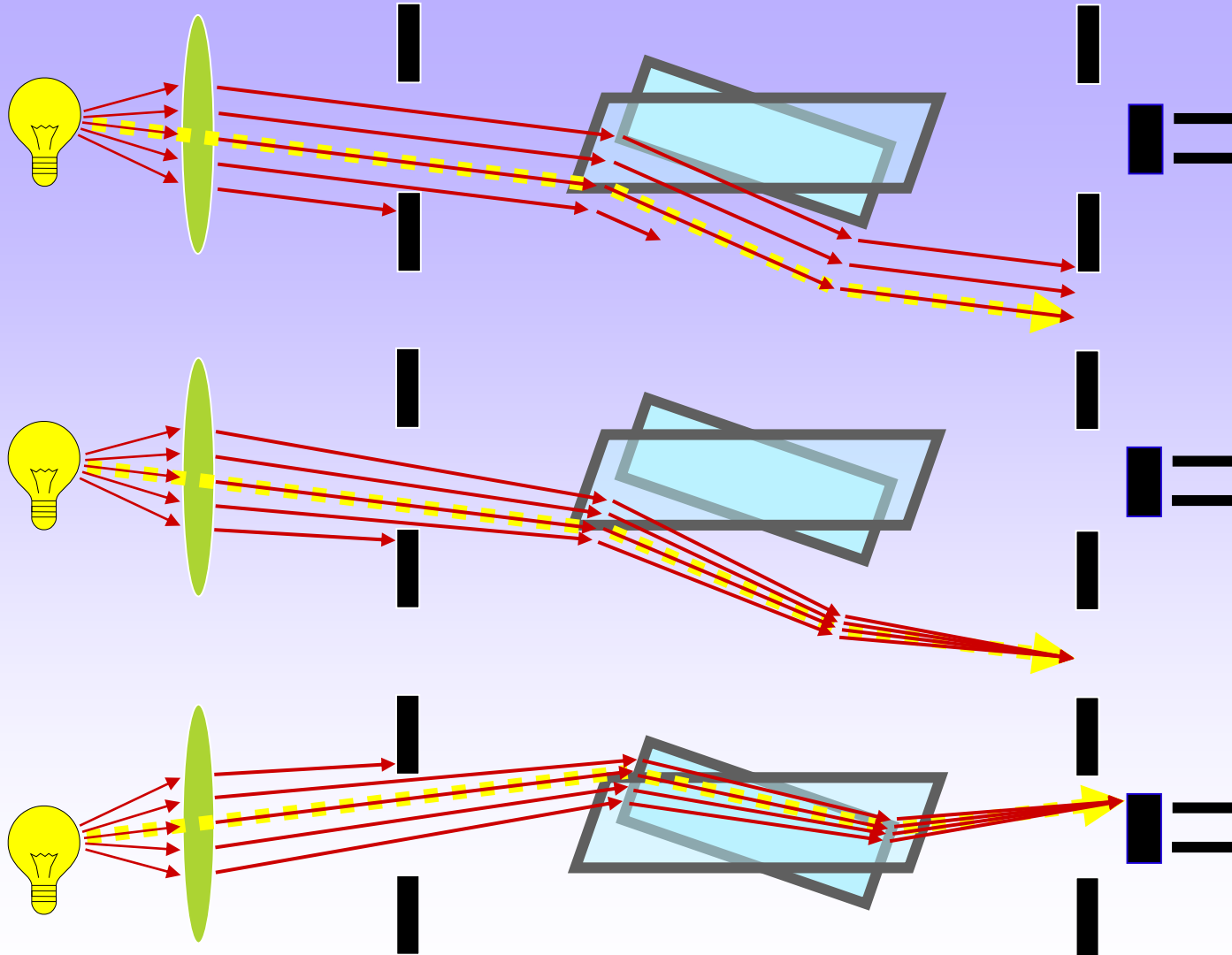
Класична оптична схема фотометра



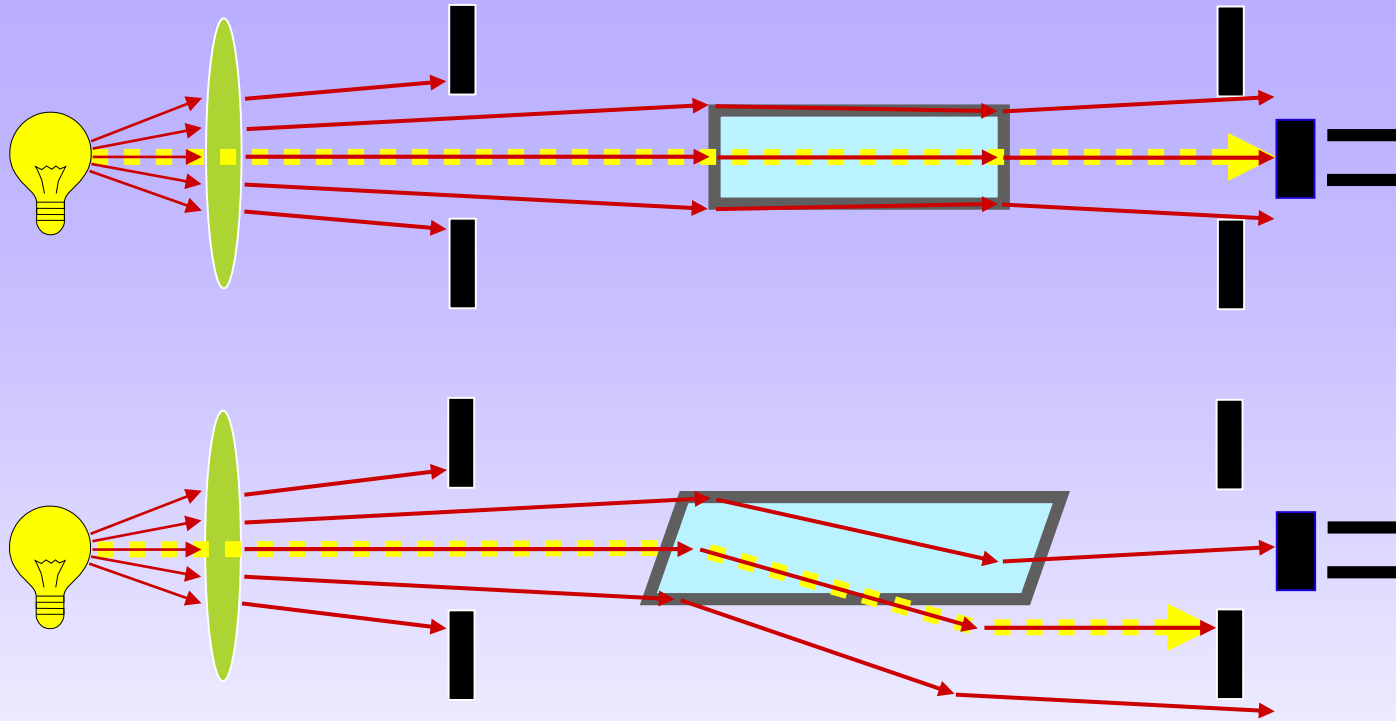
Вплив квазіпаралельності світлового потоку і довжини хвилі



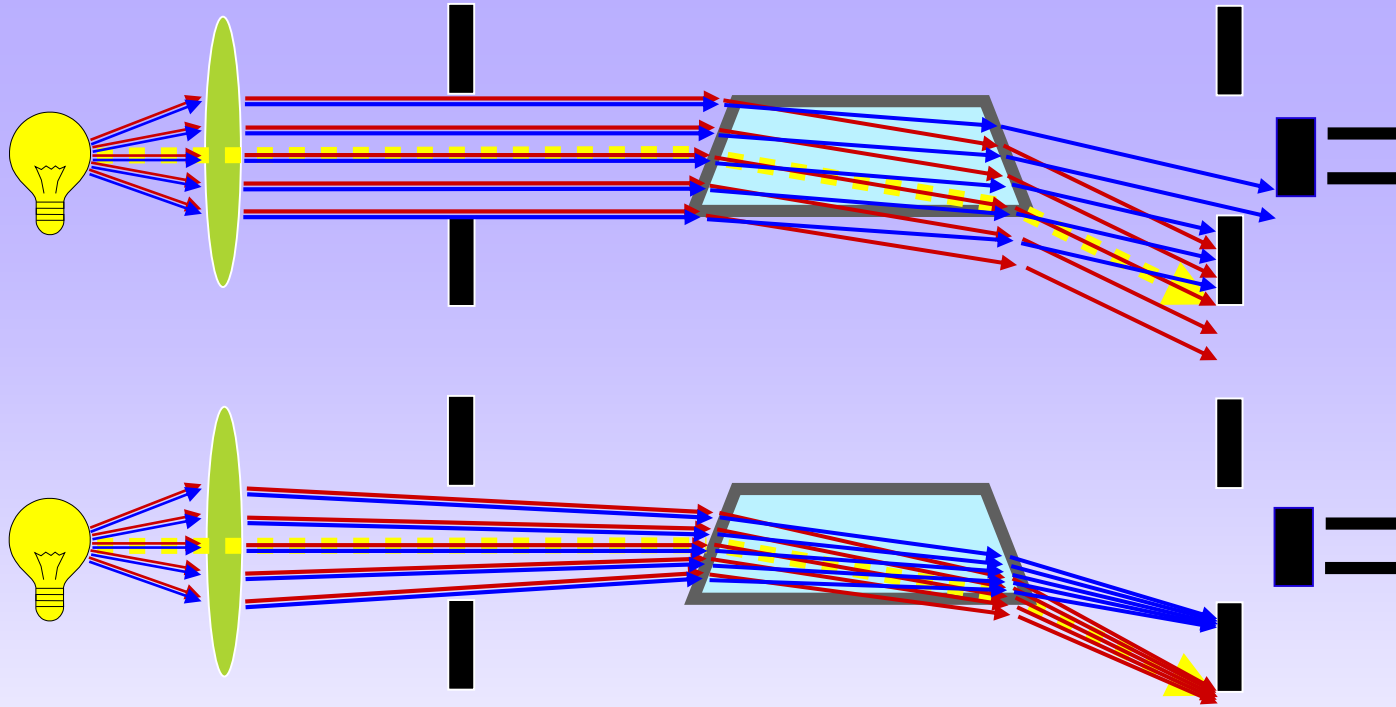
Вплив юстування лампи



Вплив квазіпаралельності світлового потоку



Вплив квазіпаралельності світлового потоку і довжини хвилі



Багатофункціональні фотометри

Поряд з одно - і двоканальними з'явилися і багатоканальні фотометри, що дозволяють вимірювати одночасно велику кількість проб, що істотно прискорює процес вимірювання.

Переваги автоматизованих фотометрів

- ▶ Головною відмінною особливістю автоматичних фотометрів (спектрофотометрів) від автоматичних аналізаторів є необхідність вручну змішувати аналізований зразок з реактивами.



Причини використання автоматичних аналізаторів



1. Економічність - 350 - 500 мкл (і менше) реагентів(!)
2. Об'єм аналізованої біологічної рідини(3 - 7 мкл)
3. Висока продуктивність (до 800 і більше досліджень в годину).
4. Автоаналізатор може експлуатуватися не менше 5-6 годин на добу.
5. Можливістю використання різних режимів визначення: по кінцевій точці, двох - багатоточкової кінетиці, з залученням технології турбідиметрії (імунонефелометрії), іонометрії, поляризаційної флюориметрії та інших.
6. Можливість програмування під реактиви різних фірм-виробників.
7. Використання невеликих (у тому числі і миючихся) вимірювальних кювет.
8. Системний підхід, який дозволяє "переглянути" сам хід реакції, виявити фазу виснаження субстрату, кофакторів (при "ручному" визначенні це виявити неможливо).
9. Здійснення контролю якості.
10. Програмне збереження бази даних.
11. Можливість виконання екстрених досліджень.
12. Зв'язок з комп'ютерами, вихід в ЛІС.
13. Широкі можливості вимірювального модуля, дозволяють реєструвати абсорбцію (за умови дотримання закону Бугера-Ламберта-Бера) в діапазоні до 2,5 од. А, що обумовлено потужним джерелом опромінення і більш чутливим приймачем світла.
14. Використання неагресивних рідин (Ферментні набори реагентів).
15. Багато автоаналізаторів оснащені йоноселективним блоком, що дозволяє, зокрема, проводити визначення іонів калію, натрію, кальцію, хлору потенціометричним методом.

Аналізатори проточно-інжекторного типу (ПІА)

- ▶ В 60-их роках ХХ століття Я. Ружичка і Е. Хансен, К. Стюарт запропонували новий різновид безперервного проточного аналізу, а саме: **проточно-інжекційний аналіз (ПІА)**
- ▶ Порівняно з безперервним проточним аналізом проточно-інжекційний аналіз (ПІА) дозволяє отримати інформацію не тільки про концентрацію досліджуваного зразка, але і про кінетику реакції яка відбувається.
- ▶ В проточно-інжекторному аналізі в якості способів детектування використовуються: **абсорбційна фотометрія (42%), флюорометрія, турбідиметрія та ін. (28%), електрохімічна детекція (29%), інші способи детекції (близько 1%).**
- ▶ Використання ПІА дозволяє значно зменшити обсяг біопроби і реагентів - за рахунок можливості здійснювати дослідження в кінетичному режимі; забезпечує високу продуктивність системи при підвищенні точності аналізу.

Відтворюваність результатів

- ▶ **Відтворюваність результатів** забезпечується тим, що на кожен етап дослідження завжди відводиться один і той самий, притому суворо певний проміжок часу. Результат аналізу розраховується шляхом зіставлення показників дослідження дослідної, контрольної та стандартної проб.

Режими вимірювання

Характер вимірювання оптичної щільності розчину оцінюється в наступних режимах:

- а) по кінцевій точці (можливість побудови калібрувальної кривої);
- б) по кінетиці;
- в) по двом точкам;
- г) за фіксованою абсорбцією;
- д) оцінка результатів за нелінійної калібрувкою (імунотурбідиметрія).

Особливості оптичної системи реєстрації:

- а) **джерело світла** (ксенонова, галогенова лампа з тривалим терміном експлуатації, лампа розжарювання, вольфрамова, вольфрамо-галогенова, кварцева);
- б) **діапазон довжин хвиль**;
- в) **монохроматизація світлового** потоку за допомогою дифракційної решітки, набору простих або інтерференційних світлофільтрів;
- г) **система детектування** світлового сигналу;
- д) **режим фотометричного вимірювання** – монохроматичний або біхроматичний.

Характер хімічної процедури

Залежно від характеру хімічної процедури досліджень розрізняють 4 основні групи методів ПІА.

- ▶ До 1-ої з них відносять способи аналізу, що базуються на звичайній "неферментативній" хімічній реакції.
- ▶ До 2-ої - способи визначення субстратів за допомогою ферментів.
- ▶ До 3-ій - методи дослідження активності ферментів.
- ▶ До 4-ої - методи імунохімічного аналізу.

Типи аналізаторів

- ▶ 1. Одноцільові біохімічні автоаналізатори, за допомогою яких в аналізованій пробі визначається лише один компонент біологічної рідини і тканини. До числа таких може бути віднесений, наприклад, аналізатор "Глюкоза-2" фірми "Beckman".
- ▶ 2. Автоаналізатори для визначення так званих родинних компонентів. Це, наприклад, автоаналізатор амінокислот, принцип дії якого заснований на хроматографічному їх розділенні (за Штейном і Муром); автоматичний атомно-абсорбційний полум'яний спектрофотометр.
- ▶ 3. Багатоцільові біохімічні автоматичні пристрої, що призначаються для встановлення вмісту в біологічних рідинах великої кількості різних за хімічною природою компонентів.

Дискретні аналізатори

У дискретних автоаналізаторах замість центрифугування та діалізу використовується велике розведення проб, при якому перешкоди від присутності білків в більшості реакцій стають мізерно малими.

Основними вузлами дискретних автоаналізаторів є:

- 1). Каруселі (картриджі) з досліджуваним біологічним матеріалом і реагентами.
- 2). Дозатори (маніпулятори).
- 3). Блок вимірювання концентрації визначуваного компонента.
- 4). Реєструючий пристрій.
- 5). Система управління комплексом перерахованих модулів.

Альтернатива дискретним аналізаторам

- ▶ Своєрідним «компромісом», об'єднуючим проточний і дискретний принципи автоматизованого дослідження, є **ротаційна система**, особливість якої полягає у використанні процесу центрифугування. При цьому змішування проби з реактивами, термостатування і вимірювання величини оптичної щільності здійснюються у період обертання ротора центрифуги: в процесі центрифугування рідина переміщається по радіальним каналах ротора у відповідні кювети, що обертаються разом з ним.
- ▶ Переважна більшість застосовуваних у лабораторії автоаналізаторів використовують дискретний принцип дослідження.



Класифікація автоаналізаторів в залежності від особливостей технології



- 1-ий клас.** Автоаналізатори "ВАТСН-системи", тобто виконання досліджень "за тестами". Характерною їх конструктивною особливістю є використання проточних кювет. Аналізатори цього типу призначені для послідовного виконання окремих методик (серій досліджень). Являють собою відкриті системи.
- 2-ий клас.** Селективні аналізатори -режим роботи «по пацієнтам» - RANDOM. Дозволяють виконувати дослідження за різними біохімічними тестами шляхом взяття (з використанням маніпулятора) окремих аліквот однієї і тієї ж проби біологічного матеріалу. Як правило, реєстрація оптичної щільності здійснюється не в проточній, а в окремій реакційній кюветі. Прилади цього типу допускають можливість проводити експрес-аналізи (в STAT-режимі: "позачергового проведення аналізу").
- 3-ий клас.** Багатофункціональні інтелектуальні системи. Призначаються для використання в лабораторіях великих лікувально-профілактичних закладів, діагностичних центрах, централізованих клініко-біохімічних лабораторіях. Містять іоноселективні блоки.

Основні параметри, на які потрібно звернути увагу при виборі аналізатора:

- ▶ - Продуктивність: кількість досліджень за годину.
- ▶ - Послідовність виконання аналізів: "за тестами" - BATCH або "по пацієнтам" - RANDOM.
- ▶ - Відкритість системи.

Групи методів

- ▶ Залежно від характеру хімічної процедури дослідження розрізняють 4 основні групи методів ПІА.
- ▶ До 1-ої з них відносять способи аналізу, що базуються на звичайній "неферментативній" хімічній реакції.
- ▶ До 2-ої - способи визначення субстратів за допомогою ферментів.
- ▶ До 3-ої - методи дослідження активності ферментів.
- ▶ До 4-ої - методи імунохімічного аналізу.

Дякую за увагу!