

«УТВЕРЖДАЮ»

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Федерального агентства по
здравоохранению и социальному
развитию» д.м.н., профессор

Долгов В.В.



Методические указания

по использованию АНАЛИЗАТОРА АКУСТИЧЕСКОГО КОМПЬЮТЕРИЗИРОВАННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЗ РЕАГЕНТОВ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА И БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА АКБа-01-«БИОМ[®]» для определения общего белка и белковых фракций сыворотки крови

Методические указания вводятся кафедрой Клинической лабораторной диагностики Государственного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последипломного образования Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (зав.кафедрой В.В.Долгов, разработчик Е.Н.Тамарова).

Согласовано:

Заведующий клиничко-диагностической
лабораторией Института клинической
кардиологии им.А.Л.Мясникова РКНПК
МзиСР РФ, д.м.н., профессор

В.Н.Титов

Handwritten signature of V.N. Titov in black ink.

д.р В. Н. ТИТОВ

Начальник отделения клинической
биохимии ГВКГ им.Н.Н.Бурденко
МО РФ

Handwritten signature of S.K. Kudryashov in black ink.

С.К.Кудряшов

Содержание

1. Введение	3
2. Назначение изделия	4
3. Определение белка и белковых фракций	4
3.1. Определяемые показатели	4
3.2. Требования	5
3.3. Пробоподготовка	5
3.4. Запуск программного обеспечения.	6
3.5. Режим калибровки	7
3.6. Рабочий режим «Общий белок».	8
3.6.1. Адаптация ячеек к сыворотке	8
3.6.2. Исследование образцов.	9
3.6.3. Создание записи в Базе данных (далее БД).	9
3.6.4. Сохранение результатов исследования.	10
3.6.5. Следующий образец сыворотки	11
3.7. Исследование белковых фракций	11
3.7.1. Подготовка ячейки.	12
3.7.2. Сохранение в базе данных распределения белковых фракций.	12
3.7.3. Печать бланков выдачи результатов.	13
3.8. Справочная информация.	14
3.9. Окончание работы	15
4. Аналитические характеристики	15
4.1. Воспроизводимость. Правильность	15
4.2. Линейность	16
4.3. Чувствительность	16
5. Контроль качества	18
6. Ограничения метода	19
7. Особенности метода	19

1. Введение

Многие физиологические и патологические процессы в организме проходят при непосредственном участии белков. Хотя на сегодняшний день возможна идентификация и количественное определение многих индивидуальных белков, определение концентрации общего белка и белковых фракций по-прежнему актуальны как ориентировочные (скрининговые) методы.

Повышение концентрации общего белка возникает при гидратации организма, аутоиммунных заболеваниях, миеломной болезни и т.д.; снижение концентрации общего белка происходит при заболеваниях печени, почек, кровотечениях, ожогах, тиреотоксикозе и т.п. При многих патологических процессах возникает диспротеинемия, т.е. изменение соотношения отдельных белков при нормальном уровне общего белка.

Для характеристики белковых фракций в клинко-диагностической лаборатории традиционно применяют электрофоретический метод разделения белков. При этом чаще получают 5 фракций.

Таблица 1.1. Некоторые белки сыворотки крови:

Фракция белков	Основные белки фракции	Концентрация в сыворотке, г/л
1. Альбумины	Альбумин	35-55
2. α 1-глобулины	α 1-антитрипсин	2-4
	α 1-кислый гликопротеид	0,2-0,4
3. α 2-глобулины	α 2-макроглобулин	3,5
	Гаптоглобин	0,4-0,75
	Церулоплазмин	0,35
4. β -глобулины	Трансферрин	2,9
	β -липопротеиды	1,0
	СЗ-комплемента	1,0
5. γ -глобулины	IgG	14
	IgA	3,5
	IgM	1,5

Однако электрофоретический метод достаточно трудоемкий и дорогостоящий.

Предлагаемый акустический метод позволяет определять общий белок и белковые фракции на основе биофизического исследования взаимодействия ультразвуковой волны с белковыми молекулами. В основе исследования лежит оценка конформации белка и взаимодействия белковых молекул с водой. Вокруг белковых молекул образуется монослой структурированной воды, повторяющий третичную и четвертичную структуру белка. Поэтому данный метод принципиально отличается по типу получаемого сигнала от биохимических методов определения концентрации белка, основанных на взаимодействии аминокислот с красителями; на реакции антиген-антитело; подвижности белковых молекул в электрическом поле и других технологий.

2. Назначение изделия

Анализатор предназначен для определения концентрации веществ в водно-солевых растворах методами биофизической акустики путем измерения резонансных частот и дальнейшей математической обработки информации.

3. Определение белка и белковых фракций

3.1. Определяемые показатели

- концентрация общего белка, г/л;
- концентрация альбумина, г/л, % от общего количества белка сыворотки;
- концентрация α 1-глобулинов, г/л, %;
- концентрация α 2-глобулинов, г/л, %;
- концентрация β -глобулинов, г/л, %;
- концентрация γ -глобулинов, г/л, %;
- соотношение альбумины/глобулины (А/Г);
- графическое изображение распределения белковых фракций.

Результаты исследования по каждому пациенту выводятся на экран компьютера, сохраняются в базе данных и могут быть распечатаны в виде бланков в любое время.

3.2. Требования

Для работы акустического анализатора АКБа-01-«БИОМ» необходимо:

- персональный компьютер (ПК) на базе Pentium I, II, III или IV с операционной системой (ОС) Win 98SE, 2000 или XP;
- установочный диск с программным обеспечением «БИОМ»;
- принтер

Управление анализатором осуществляется при помощи ПК.

3.3. Пробоподготовка

Исследованию подвергается свежая сыворотка крови в объеме не менее 450 мкл (хранение крови допускается в холодильнике при 2-8°C до 3-4 суток).

Необходимо приготовить 2 образца сыворотки каждого пациента:

неизмененную и модифицированную. Для приготовления модифицированной сыворотки отбирают 200 мкл сыворотки крови в отдельную пробирку и добавляют 110 мкл раствора **A**, после перемешивания осторожно по стенке пробирки наслаивают 200 мкл раствора **B**. После тщательного перемешивания центрифугировать образец при 7000 об⁻¹ 3 мин. Для исследования используют надосадочную жидкость.

Растворы **A** и **B** являются биофизическими компонентами акустического анализа белковых фракций сыворотки крови и представляют собой неотъемлемую часть анализатора АКБа-01-«БИОМ», включены в комплект поставки. Раствор **A** – (6,25 ±0,02)%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТУ 472 К-С 14/499-007-92) в дистиллированной воде. Раствор **B** – (2±0,02)%-ный раствор бикарбоната натрия (ГОСТ 2156-76) в дистиллированной вод.

Рис.3.2. Окно «калибровочные частоты». Готовность прибора к калибровке.

** - Производитель может выпускать анализатор в одноканальном исполнении (одна ячейка). Здесь и далее по тексту для одноканального исполнения все операции проводятся с одной ячейкой, индикация и управление только Н2.

3.5. Режим калибровки

Анализатор акустический АКБа-01-«БИОМ» имеет 2 ячейки для проведения исследований. Калибровка прибора заключается в измерении резонансных частот в обеих ячейках при помещении в них дистиллированной воды.

Рабочий объем ячеек 80 – 120 мкл (точное значение указывается в РЭ).

Необходимо промыть ячейки дистиллированной водой не менее 5 раз, затем залить в ячейки рабочий объем воды не допуская образования пузырьков.

Убедитесь, что установлен режим «Калибровка», затем кнопку 

(«паспорт») и  («пуск»). Через 30-60 с (точное значение указывается в РЭ) значения резонансных частот будут отражены в окне «калибровочные частоты» (рис.3.2) и в открывшемся окне «паспорт» (рис.3.3).



Паспорт		
1 канал	2 канал	
7695-7705	8124-8134	
V1	V2	dV
7700.49	8129.61	429.12
7700.50	8129.63	429.13

Рис.3.3. Окно « паспорт»

В столбце «1 канал» указан диапазон, в который должно попасть значение Н1 (оно отражено в столбце V1), а в столбце «2 канал» диапазон для Н2 (в столбце V2). Если значения соответствуют указанному диапазону, измерение нужно повторить 2 раза, каждый раз меняя дистиллированную воду в ячейках. Разница между двумя соседними значениями в столбце dV не должна превышать $\pm 0,5$. В случае выполнения этих условий калибровка закончена, иначе промывку ячеек и измерение калибровочных частот необходимо повторить.

Если одно или оба значения Н1, Н2 не укладываются в данный диапазон, необходимо тщательно промыть ячейки и повторить измерение. Если значения калибровочных частот снова не попадают в заданные «Паспортом»

интервалы, или разница соседних значений в столбцах V1 и/или V2 больше вышеуказанной, констатируется неисправность анализатора.

Для устранения неисправности необходимо вызвать представителя предприятия – изготовителя!

3.6. Рабочий режим «Общий белок».

На главной панели программы заменить переключатель «Калибровка» на «Общий белок» (рис.3.4).

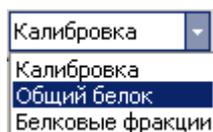


Рис.3.4. Переключатель режима работы прибора.

На панели прибора видим, что прибор перешел в режим измерения S0, S1 для измерения акустических параметров (АКП) сыворотки крови (рис.3.5).

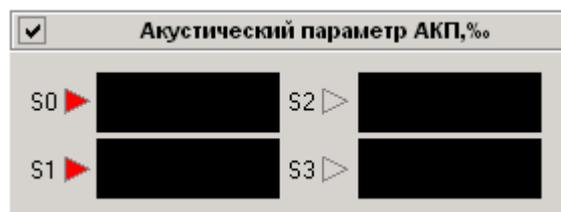


Рис.3.5. Окно рабочего режима для исследования сыворотки. Прибор готов к определению концентрации общего белка.

3.6.1. Адаптация ячеек к сыворотке.

Удалить воду из обеих ячеек, дважды промыть ячейки любой сывороткой. Поместить рабочий объем сыворотки в каждую ячейку. Провести пробное исследование для адаптации ячейки. Для этого при открытом окне «Паспорт» (рис.3.3) активировать кнопку  («пуск»). Через 60 с термостатирования образца происходит измерение показателей, и на экране появляется сообщение об окончании процедуры (рис.3.6).

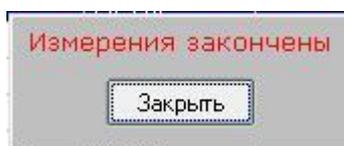


Рис.3.6. Для продолжения работы нажать эту кнопку.

Сделать еще заливку и нажать «пуск». В окне «Паспорт» разница параметров первой и второй заливок в столбце V1 ($V_{1_1}-V_{1_2}$) и/или столбце V2 ($V_{2_1}-V_{2_2}$) должны изменяться не более $\pm 0,25$. Если произошло превышение, необходимо произвести еще одну заливку и нажать «Пуск». Сравнить разницу параметров второй и третьей заливки в столбцах V1 и/или столбцах V2. Разница не более $\pm 0,25$. Если условие выполняется, то ячейка полностью адаптирована к исследуемой жидкости. Если контролируемый параметр вновь не удовлетворяет заданным требованиям необходимо обратиться на предприятие - изготовитель анализатора.

3.6.2. Исследование образцов.

Убрать из ячеек сыворотку. Промыть один раз ячейки первой исследуемой сывороткой, залить ее в обе ячейки и нажать «пуск».

3.6.3. Создание записи в Базе данных (далее БД).

Во время термостатирования исследуемого образца создать новую запись в БД (рис 3.7).

№	Дата	Время	Пол	Диагноз	Врач
	ФИО		Возр.	Отделение	№ ист. болезни
5	05.05.04	16:16	М		Петрова к.м.н.
	Иванов Иван Иванович		37	амбулат...	231

12 Insert NUM 11.05.04 13:56 Изменение

Рис.3.7. Окно «База данных».

База данных предназначена для хранения данных пациентов. База организована в виде таблицы. Данные по каждому пациенту располагаются в две строки. Доступные для заполнения данные: номер исследуемого образца; фамилия; имя; отчество пациента, пол (М / Ж), возраст, диагноз, отделение, ФИО лечащего врача и номер истории болезни. После ввода символов в любое из перечисленных полей БД обязательно **нажимать клавишу «Enter»** для сохранения. Результаты исследования отображаются в отдельном окне (рис.3.9). Добавление и удаление записей осуществляются с помощью соответствующих пунктов меню или на панели инструментов. Для

создания новой записи необходимо активировать кнопку «+» (рис.3.8). Навигация по базе осуществляется как с помощью клавиш на клавиатуре (Up, Down, Left, Right, Home, End, Page Up, Page Down), так и с помощью панели навигации БД (рис.3.8).

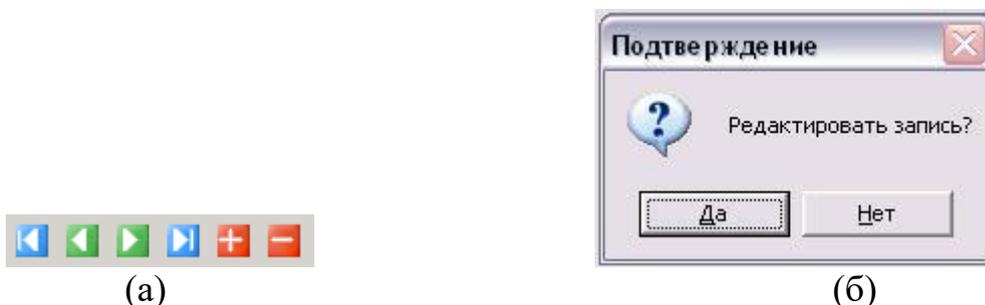


Рис.3.8 Управление БД (а) -панель навигации, (б) – блокировка несанкционированного редактирования БД

Для удаления строки в БД необходимо поставить курсор мыши на выбранную запись с данными пациента и нажать кнопку « - ».

Для записи существует функция защиты от случайного редактирования. Запись считается завершенной, если курсор мыши вышел из заполняемой текущей строки БД. При повторном попадании курсора на эту строку и изменении ее содержимого всплывет табличка с вопросом рис 11 (б), при желании сделать исправление или дополнения к этой записи необходимо нажать «Да» и произвести ввод.

3.6.4. Сохранение результатов исследования.

После завершения измерения, результат необходимо записать в базу данных.

Для этого нажав на кнопку  сохранить данные.

В окне «Результаты исследования» (рис.3.9) появится строка № 1.

3.7.1. Подготовка ячейки.

Промыть ячейку 1 раствором соды 2^{-x} % два раза. Ячейка 2 промывается пять раз водой, затем заливается вода и в процессе работы к ней далее не обращаются. Два раза промыть ячейку 1 модифицированной сывороткой первого пациента и залить в ячейку (используется надосадочная жидкость! – см. пункт 3.3). Нажать кнопку «Пуск».

3.7.2. Сохранение в базе данных распределения белковых фракций.

Перейти к БД (поместить на любое поле БД курсор мыши и однократно нажать левую кнопку). Отметить пациента, модифицированную сыворотку которого залили в ячейку 1. Поиск нужного пациента в БД, когда проведено много исследований за продолжительный отрезок времени можно производить вручную или воспользоваться предусмотренной функцией (рис.3.11).



№	Дата	Время	Пол	Диагноз	Врач
1	16.02.05	11:50	М		Иванова
	Петров П.П.		40	амбулатор	1212
2	13.05.05	16:23	Ж		Иванова
	Сидорова И.А.		45	стационар	1123
3	19.05.05	03:17	М		
	Иванов И.И.		25		0

Рис.3.11.Прежде, чем сохранить данные по белковым фракциям, необходимо установить курсор в базе данных на пациента, чья сыворотка исследуется в данный момент. Первично база по пациенту заполняется при определении концентрации общего белка (см. пункт 3.6.3).

При успешном завершении записи в окне «Результаты исследования» появятся строки №№ 2-7 (рис.3.9). В окне графического представления результатов (рис.3.12) появится график распределения белковых фракций. В

поле «комментарий» можно заносить сопроводительные записи для лечащего врача с особенностями образца данного пациента.

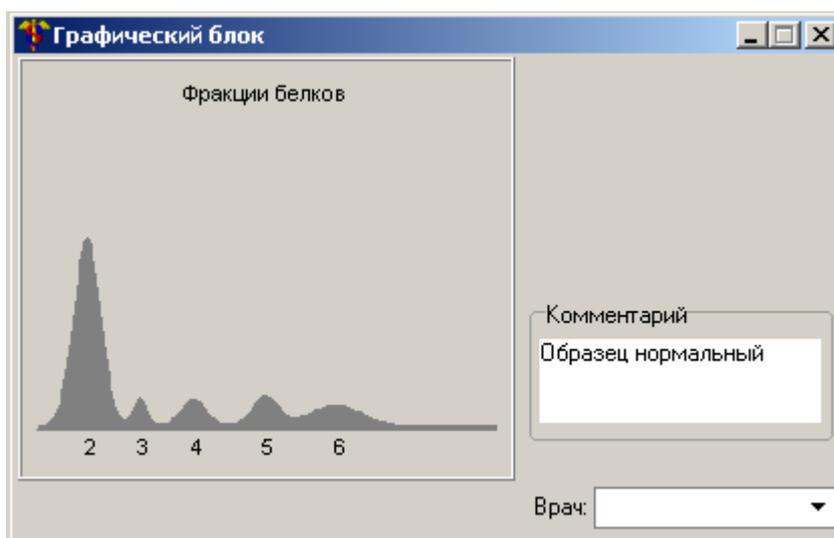


Рис.3.12.График распределения белковых фракций выглядит как при традиционном электрофоретическом распределении.

3.7.3. Печать бланков выдачи результатов.

Вывод результатов исследования на печать в виде бланков производится стандартным для Windows способом, нажав на кнопку  (рис.3.13) при подключенном принтере. Возможен предварительный просмотр бланка для конкретного пациента, используя кнопку .

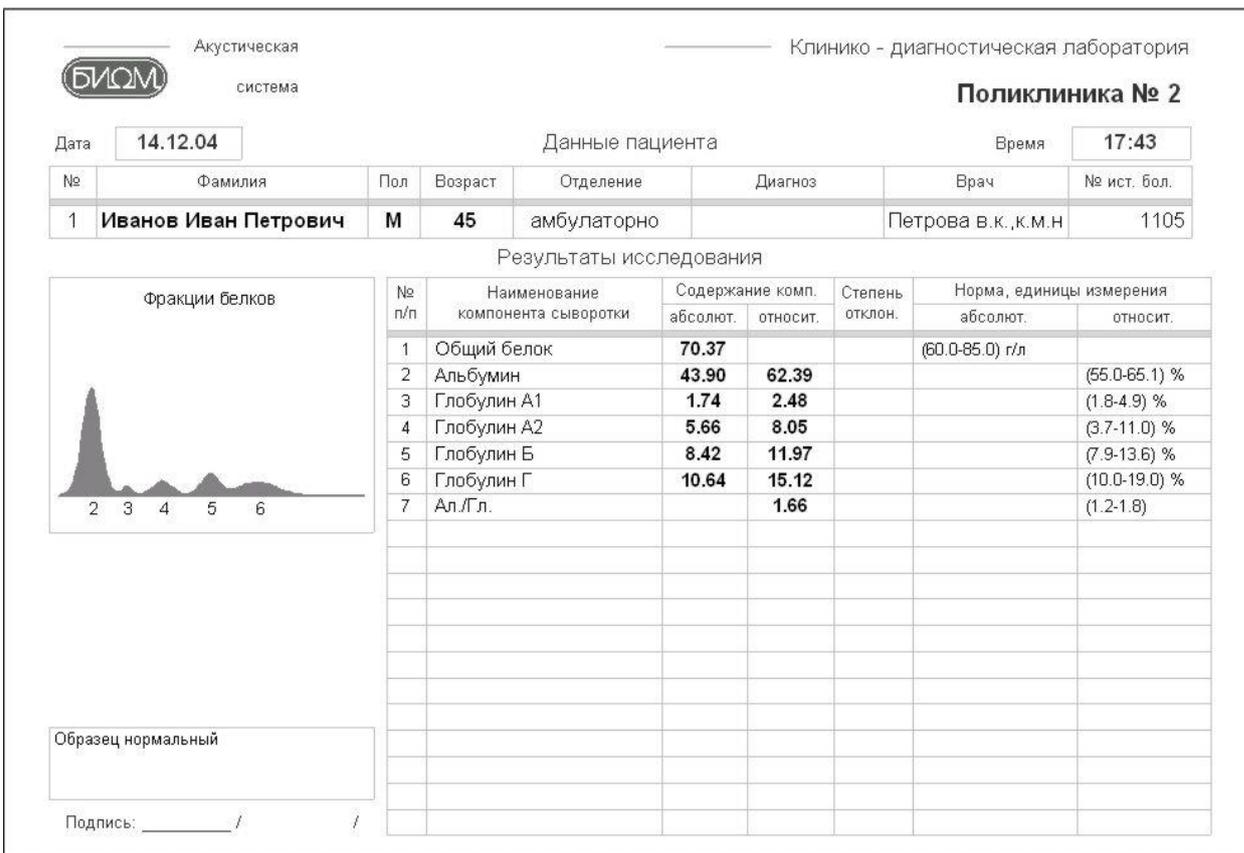


Рис.3.13. Распределение белковых фракций в абсолютных (г/л) и относительных (%) единицах измерения. Бланк выдачи результатов.

3.8. Справочная информация.

Нажав кнопку «Справка» в главном меню программы, можно получить информацию об анализаторе и программе, а также вызвать справочную информацию по всем разделам работы программы (рис.3.14). Для получения необходимой информации щелкнуть мышью на соответствующем заголовке. Появившийся на экране текст можно листать с помощью расположенной справа линейки.

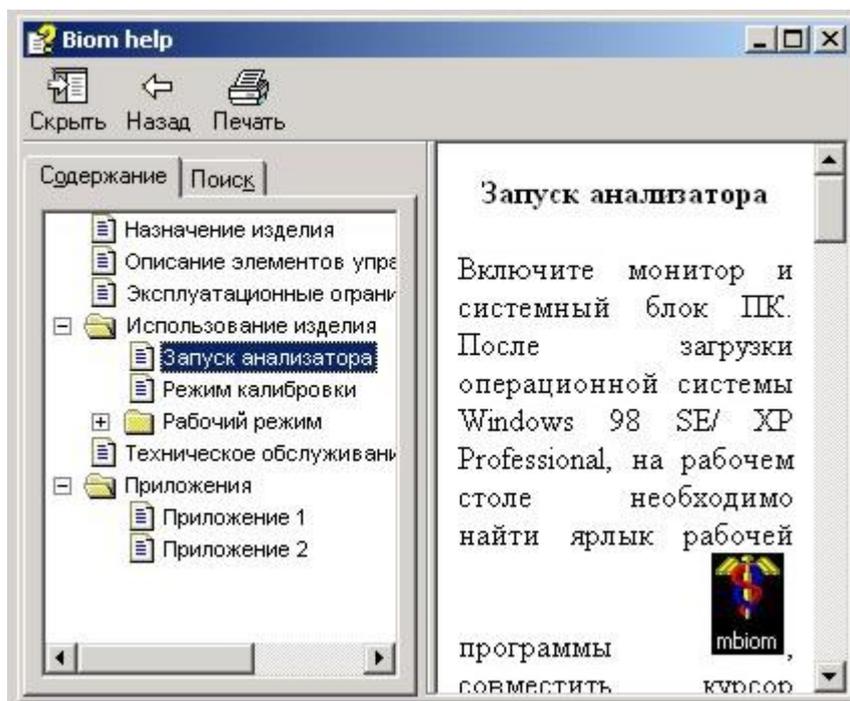


Рис.3.14. Справка о работе программы.

3.9. Окончание работы.

Удалить сыворотку из акустических ячеек. Промыть ячейки дистиллированной водой не менее 10 раз и поместить в каждую двойной рабочий объем воды. На главной панели нажать кнопку выхода из программы. Выключить компьютер и анализатор.

4. Аналитические характеристики

4.1. Воспроизводимость. Правильность

В образцах крови, контрольных материалах и сливной сыворотке (контрольном материале самостоятельного приготовления) значения коэффициентов вариации и смещения соответствуют биологически обоснованным нормам аналитической точности по приказу №220 МЗ РФ от 26.05.03.

Таблица 4.1. Коэффициенты вариации и смещения, полученные при определении белковых фракций в контрольном материале «Serodos»/Human, Германия/ и сливной сыворотке на приборе «БИОМ».

Фракции белков	“Serodos”		Сливная сыворотка
	CV ₁₀ , %	B ₁₀ , %	CV ₁₀ , %
Альбумин	5,2	-4,9	3,5
α_1 – глобулины	17,8	+8,2	5,0
α_2 – глобулины	10,8	-1,6	2,3
β – глобулины	3,2	+2,4	2,0
γ – глобулины	12,9	+7,2	9,6
Общий белок	0,26	-3	1,7

4.2. Линейность

Для концентрации общего белка линейность сохраняется в диапазоне значений 15-150г/л.

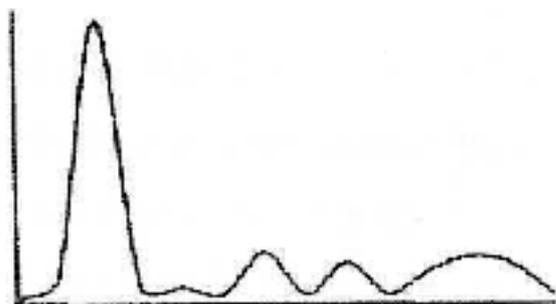
4.3. Чувствительность

При выявлении всех характерных патофизиологических состояний (синдромов) акустический метод показывает те же изменения, что и при классическом электрофорезе.

При исследовании сыворотки крови акустическим методом на анализаторе АКБа-01-«БИОМ» выявляются те же 5 фракций, как при классическом электрофорезе. При исследовании этим методом выявляются характерные патофизиологические изменения белковых фракций для следующих синдромов:

- нефротический синдром;
- синдром острого воспаления;
- синдром хронического воспаления;
- присутствие парапротеинемий.

При этом состав белковых фракций определяется как в относительных единицах измерения (% от общего белка), так и в абсолютных (г/л).



Альбумин	52-65%	35-50 г/л
Альфа1	2-4,5%	1-3 г/л
Альфа2	10-15%	6-9 г/л
Бета	6-13%	4-9 г/л
Гамма	10-19%	6-13 г/л
Общ. Белок		65-85 г/л

Рис. 4.1. Распределение белковых фракций, полученное акустическим методом на приборе «БИОМ» для здоровых людей (референтные значения нормы).

Таблица 4.2. Изменения соотношения отдельных фракций, выявленные при электрофоретическом разделении белков в группе пациентов с нефротическим синдромом и соответствующие им изменения на приборе «БИОМ».

Белковые фракции	«БИОМ» (акустический метод)				«PARAGON»/Beckman/ (электрофорез)			
	Среднее значение в контрольной группе, %	Среднее значение в группе больных с нефротическим синдромом	Изменение показателя		Среднее значение в контрольной группе, %	Среднее значение в группе больных с нефротическим синдромом	Изменение Показателя	
			Характер изменения	Статистическая значимость			Характер изменения	Статистическая значимость
Альбумин	52,3 ± 0,7	46,0 ± 0,8	↓	+	62,4 ± 1,0	60,2 ± 0,8	↓	-
α_1^- глобулины	4,0 ± 0,2	5,1 ± 0,13	↑	-	2,8 ± 0,2	5,6 ± 0,13	↑	+
α_2^- глобулины	10,2 ± 0,2	19,4 ± 0,4	↑	+	7,5 ± 0,4	10,3 ± 0,4	↑	+

β - глобулины	11,7±0,2	14,8±0,3	↑	+	12,4±0,4	13,7±0,3	↑	-
γ - глобулины	21,8±0,6	14,7±0,6	↓	+	14,8±0,7	10,2±0,6	↓	-
n	36	7			36	7		

В таблицу внесены значения фракции в виде $M \pm m$, где M – средняя величина по выборке, m - ошибка средней, n – число измерений. Видно, что направления сдвигов совпадают для двух методов. Характерно снижение уровня альбуминов и увеличение глобулинов (кроме γ -фракции). n - число пациентов в группе. Статистическая значимость проверялась для уровня значимости 5% при помощи непараметрического Т-критерия Манна-Уитни с поправкой Йетса.

- Чувствительность акустического метода в случаях с парапротеинемиями была не более 90%, а при концентрации общего белка <80г/л не более 70%. Акустический метод и анализатор АКБа-01-«БИОМ» не рекомендуется применять в специализированных гематологических центрах для наблюдения пациентов с парапротеинемиями в динамике.
- Специфичность

Ложноположительных результатов в ходе работы с прибором выявлено не было, таким образом, специфичность метода близка к 100%, следовательно, акустический метод может применяться для скрининговых исследований.

5. Контроль качества

Калибровка прибора проводится ежедневно перед началом работы при помощи дистиллированной воды, при этом программа не позволяет пропустить этот шаг в работе. Не существует аттестованных контрольных

материалов для акустического метода определения белковых фракций. Большинство контрольных материалов не пригодны для акустического исследования, т.к. они подвергаются лиофилизации, либо содержат консерванты. При испытании прибора для исследования белковых фракций применяли контрольные материалы “Serodos Plus”/Human,Германия/, однако нет гарантии, что метод будет работать с другой серией того же контрольного материала в дальнейшем (необходимо использование каждого нового лота согласовывать с производителем анализатора). Рекомендуем для проведения контроля качества приготовление сливной сыворотки для контроля сходимости и воспроизводимости.

6.Ограничения метода

- Для исследования применяется только свежая неизменная сыворотка (возможно хранение в холодильнике при $t=2-8^{\circ}\text{C}$ до 3-4 дней).
- Требуется не менее 450 мкл сыворотки.
- Не рекомендуется применять акустический метод для наблюдения за пациентами специализированных гематологических отделений ввиду низкой специфичности метода для случаев парапротеинемий.

7.Особенности метода

- Для калибровки прибора достаточно наличия дистиллированной воды.
- После акустического метода исследования сыворотку можно использовать для других биохимических тестов.
- Влияния интерферирующих факторов крови на акустическое исследование не выявлено.
- Необходимо избегать попадания инородных частиц и пузырьков воздуха в акустические ячейки при исследовании сыворотки.

Таким образом, акустический метод и анализатор АКБа-01-«БИОМ» может применяться для скрининговых исследований в поликлиническом звене лабораторной службы и других лечебных учреждениях для наблюдения за пациентами в динамике и при первичном обследовании.

Литература

1. Долгов В.В., Шевченко О.П. Лабораторная диагностика нарушений обмена белков. Учебное пособие.-М., 1197.
2. Тамарова Е.Н.,Клемин В.А., Долгов В.В. Акустическое (ультразвуковое) определение общего белка и белковых фракций сыворотки крови. Клиническая лабораторная диагностика.-2005.-№2.- с.12-18.