

МЕДИЦИНСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

РУКОВОДСТВО ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Под редакцией профессора А.И. Карпищенко

Том 2



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2013

УДК 616-07(035)

ББК 53.4я81

М42

Авторский коллектив: проф. *В.В. Алексеев*; канд. техн. наук *А.Н. Алипов*; канд. мед. наук *В.А. Андреев*; д-р мед. наук *В.Г. Антонов*; канд. биол. наук *М.В. Асеев*; проф. *В.Д. Бадиков*; проф. *В.С. Баранов*; проф. *А.Г. Бойцов*; д-р мед. наук *В.Н. Болехан*; канд. мед. наук *А.Б. Бутенко*; канд. мед. наук *И.И. Волков*; канд. биол. наук *А.С. Глотов*; д-р мед. наук *С.И. Глушков*; д-р биол. наук *В.Н. Горбунова*; канд. мед. наук *В.И. Государский*; д-р мед. наук *Р.А. Грашин*; *А.В. Ёлкин*; канд. биол. наук *О.А. Ефимова*; канд. мед. наук *С.Н. Жерегеля*; проф. *Е.Б. Жибурт*; канд. мед. наук *Д.Т. Жоголев*; *Н.М. Запольская*; канд. мед. наук *Ю.Ф. Захаркив*; д-р биол. наук *А.В. Зачиняева*; проф. *А.М. Иванов*; д-р биол. наук *Т.Э. Иващенко*; канд. мед. наук *М.М. Карапац*; проф. *А.И. Карпищенко*; проф. *С. А. Карпищенко*; д-р мед. наук *В.А. Кашиуро*; канд. биол. наук *Л.И. Клецко*; проф. *С.С. Козлов*; проф. *Е.Н. Колосовская*; канд. физ.-мат. наук *А.А. Копылов*; канд. мед. наук *С.А. Краевой*; канд. мед. наук *А.Б. Криворучко*; проф. *В.В. Кузнецов*; д-р биол. наук *Т.В. Кузнецова*; канд. мед. наук *Т.Г. Кулибаба*; канд. мед. наук *О.Н. Листовка*; канд. биол. наук *Ю.А. Логинова*; проф. *М.Я. Малахова*; *Г.И. Маслова*; канд. мед. наук *М.Л. Медведев*; канд. мед. наук *Н.В. Михайлов*; канд. биол. наук *Н.П. Михалева*; канд. мед. наук *В.Н. Мокроусов*; д-р мед. наук *О.Л. Молчанов*; проф. *А.В. Москалев*; *Л.М. Муравник*; канд. мед. наук *П.В. Начаров*; проф. *А.Ф. Никитин*; д-р мед. наук *В.Ю. Никитин*; проф. *В.О. Никифоров*; проф. *А.А. Новик*; д-р мед. наук *В.И. Новик*; канд. биол. наук *А.А. Пендина*; проф. *Н.Г. Петрова*; д-р мед. наук *А.А. Порин*; канд. техн. наук *Н.М. Сафьянников*; проф. *В.Б. Сбойчаков*; проф. *Е.П. Сиволодский*; д-р мед. наук *С.В. Скворцов*; канд. мед. наук *В.В. Смирнов*; канд. биол. наук *А.М. Сокурова*; д-р мед. наук *А.И. Соловьев*; канд. биол. наук *И.Д. Федорова*; проф. *Л.А. Хоровская*; проф. *В.Н. Цыган*; канд. мед. наук *А.М. Чайка*; проф. *А.В. Четкин*; канд. биол. наук *О.Г. Чирьева*; канд. биол. наук *Е.П. Шелепина*; канд. мед. наук *Л.А. Шеголева*; проф. *В.Л. Эмануэль*.

Рецензенты: проф., президент Российской ассоциации клинической лабораторной диагностики *Д. Б. Сапрыгин*; проф., вице-президент Российской ассоциации клинической лабораторной диагностики, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова *В.Л. Эмануэль*.

М42 Медицинские лабораторные технологии : руководство по клинической лабораторной диагностике : в 2 т. / [В. В. Алексеев и др.] ; под ред. А. И. Карпищенко. — 3-е изд., перераб. и доп. — Т. 2. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 792 с. : ил.

ISBN 978-5-9704-2275-5 (т. 2)

ISBN 978-5-9704-2276-2 (общ.)

Издание состоит из двух томов. В первом томе руководства освещены вопросы химических основ лабораторных технологий, представлена роль международной системы единиц в клинико-диагностических исследованиях, рассмотрено оборудование для лабораторных исследований и описано проведение контроля качества. Подробно изложены методы исследований мочи, кала, желудочного, дуоденального и трахеобронхиального (мокрота) содержимого, трансудатов и экссудатов, цереброспинальной, амниотической, семенной и влагалищной жидкости, лабораторные методы исследований в гематологии и лабораторная диагностика паразитарных болезней.

Во втором томе руководства представлены методы клинической биохимии, исследования системы гемостаза, лабораторные методы иммунного анализа и оценки иммунного статуса, основы техники бактериологических и вирусологических исследований, лабораторная диагностика микозов, генных болезней и эндогенной интоксикации, освещены цитогенетические и цитологические методы, а также иммуногематологические исследования при переливании крови.

Руководство предназначено врачам клинической лабораторной диагностики, врачам различных специальностей, студентам медицинских вузов и учащимся средних медицинских учебных заведений, сотрудникам организаций-производителей и дистрибьюторам продукции для медицинских лабораторных исследований.

УДК 616-07(035)

ББК 53.4я81

Права на данное издание принадлежат ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа». Воспроизведение и распространение в каком бы то ни было виде части или целого издания не могут быть осуществлены без письменного разрешения ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа».

ISBN 978-5-9704-2275-5 (т. 2)
ISBN 978-5-9704-2276-2 (общ.)

© Коллектив авторов, 2013
© ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2013
© ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа»,
оформление, 2013

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ

16.1. ФЕРМЕНТЫ

Ферменты (энзимы) — вещества белковой природы, обеспечивающие специфический высокоскоростной катализ биохимических реакций. Как правило, определенный фермент обеспечивает протекание определенной реакции в оптимальных условиях (рН, температура, концентрация субстрата, наличие активаторов и ингибиторов).

Согласно международной классификации, различают шесть классов ферментов:

- оксидоредуктазы, катализирующие окислительно-восстановительные реакции;
- трансферазы, переносящие группы атомов, отличные от атомов водорода;
- гидролазы, расщепляющие связи с участием молекулы воды;
- лиазы, обеспечивающие образование двойных связей за счет удаления или добавления групп атомов;
- изомеразы, осуществляющие внутримолекулярный перенос групп атомов и образование изомерных форм;
- лигазы, соединяющие две молекулы с образованием связей С—С, С—О, С—S, С—N и разрывом пиррофосфорной связи АТФ.

В зависимости от механизма действия выделяют ферменты с относительной и абсолютной специфичностью. Для ферментов с относительной специфичностью существенное значение имеет тип химической связи в молекуле субстрата (пищеварительные ферменты). Абсолютная специфичность действия заключается в способности фермента катализировать превращение только определенных молекул (аргиназа, уреазы).

Большинство ферментов, обеспечивающих катализ в живых организмах, находится во внутриклеточной среде (в цитоплазме и органеллах). Тем не менее о скорости синтеза ферментов и интенсивности выхода из клеток можно судить по их активности в биологических жидкостях (кровь, слюна, ЦСЖ и др.).

Наиболее важным в диагностическом процессе является исследование ферментов плазмы крови. Ферменты, которые в норме обнаруживаются в

плазме или сыворотке крови, условно можно разделить на три группы: секреторные, индикаторные и экскреторные.

Секреторные ферменты, синтезируясь в печени, в норме выделяются в плазму крови, где играют определенную физиологическую роль. Типичными представителями данной группы являются ферменты, участвующие в процессе свертывания крови, и сывороточная холинэстераза.

Индикаторные (клеточные) ферменты попадают в кровь из тканей, где они выполняют определенные внутриклеточные функции. Одни из них находятся, главным образом, в цитозоле клетки (ЛДГ, альдолаза), другие — в митохондриях (глутаматдегидрогеназа), третьи — в лизосомах (β -глюкуронидаза, кислая фосфатаза) и т. д. Большая часть индикаторных ферментов в норме определяется в сыворотке крови лишь в следовых количествах. При поражении тех или иных тканей ферменты из клеток «вымываются» в кровь; их активность в сыворотке резко возрастает, являясь индикатором степени и глубины повреждения этих тканей.

Экскреторные ферменты синтезируются главным образом в печени (лейцинаминопептидаза, щелочная фосфатаза и др.). В физиологических условиях эти ферменты в основном выделяются с желчью. Еще не полностью выяснены механизмы, регулирующие поступление данных ферментов в желчные капилляры. При многих патологических процессах выделение экскреторных ферментов с желчью нарушается, а их активность в плазме крови повышается.

Особый интерес для клинической практики представляет исследование активности индикаторных ферментов в сыворотке крови, так как по появлению в плазме или сыворотке крови ряда тканевых ферментов в повышенных количествах можно судить о функциональном состоянии и поражении различных органов (например, печени, сердечной мышцы и скелетной мускулатуры). При остром инфаркте миокарда особенно важно исследование активности креатинкиназы, АсАТ, ЛДГ и оксидированной тиратдегидрогеназы.

При заболеваниях печени, в частности при вирусном гепатите, в сыворотке крови значитель-

7. DL-аланин или L-аланин ($\text{CH}_3\text{CHNH}_2\text{COOH}$).
8. 0,4 М раствор гидроксида натрия (NaOH), свободного от карбонатов. Емкости с раствором NaOH закрывают пробками с поглотительными трубками, заполненными натронной известью.
9. Субстратный раствор для определения АсАТ: 29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 2,66 г DL-аспарагиновой кислоты (при использовании вместо DL-аспарагиновой кислоты L-аспарагиновой кислоты навеска уменьшается вдвое) растворяют в 1 М растворе гидроксида натрия. Гидроксид натрия следует прибавлять осторожно, небольшими порциями, до полного растворения составных частей и получения pH 7,4. Раствор переливают в мерную колбу вместимостью 100 мл, ополаскивая 0,1 М фосфатным буфером с pH 7,4. Доливают буферный раствор в колбу до метки, тщательно перемешивают, прибавляют 1 каплю хлороформа и сохраняют в холодильнике в замороженном виде. Перед употреблением замороженный раствор должен полностью оттаять (повторное оттаивание не рекомендуется).
10. Субстратный раствор для определения АлАТ: 29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 1,78 г DL-аланина (при использовании вместо DL-аланина L-аланина навеска уменьшается вдвое) взвешивают на аналитических весах. Дальнейшая работа проводится так же, как для субстратного раствора АсАТ.
11. Калибровочный раствор пирувата натрия ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$): 11 мг кристаллического пирувата натрия (белого цвета) растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой; 1 мл раствора содержит 110 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг (или 1 мкмоль) пирувиноградной кислоты.

Материал для исследования. Сыворотка крови без признаков гемолиза.

Ход определения АсАТ. В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора для определения АсАТ, нагревают при 37 °С в течение 5 мин, добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки крови и инкубируют при 37 °С 30 мин. Затем добавляют 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина и выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре. Добавляют 5 мл 0,4 М раствора гидроксида натрия, тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 10 мин при комнатной температуре. Фотометрируют при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с длиной оптического пути 10 мм против контрольной пробы.

Контрольную пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после инкубации.

Ход определения АлАТ. В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора АлАТ и нагревают при 37 °С в течение 5 мин, затем добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки крови и инкубируют при 37 °С 30 мин. Дальнейший анализ осуществляют так же, как и при определении АсАТ.

Расчет активности ферментов в сыворотке крови производят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. Из калибровочного раствора пирувата натрия готовят ряд разведений (табл. 16.1).

Калибровочные пробы ставят так же, как опытные, но вместо сыворотки крови вносят разведенные калибровочные растворы. Фотометрируют против контрольной пробы, в которую вместо калибровочного раствора добавляют дистиллированную воду. Калибровочный график сохраняет линейность до величины экстинкции 0,3.

Нормальные величины: активность АсАТ, АлАТ должна находиться в пределах 28–190 нмоль/(с·л) при 37 °С.

Таблица 16.1

Построение калибровочного графика для определения активности АсАТ и АлАТ

№ пробирки	Калибровочный раствор пирувата натрия, мл	Вода дистиллированная, мл	Пирувиноградная кислота		Активность фермента (АсАТ, АлАТ), нмоль/(с·л)
			мкг	мкмоль	
1	0,05	0,55	4,4	0,05	278
2	0,1	0,5	8,8	0,1	556
3	0,15	0,45	13,2	0,15	834
4	0,2	0,4	17,6	0,2	1112
5	0,25	0,35	22,0	0,25	1390

Унифицированный метод определения активности АсАТ по оптимизированному оптическому тесту

Принцип метода заключается в различии поглощения при длине волны 340 нм восстановленной (НАД·Н) и окисленной (НАД) форм никотинамидадениндинуклеотида. При длине волны 340 нм НАД·Н имеет максимальную абсорбцию, тогда как НАД при этой длине волны поглощения не имеет.

1. Основная реакция:



2. Индикаторная реакция:



Реактивы

1. Дигидрофосфат калия (K_2HPO_4).
2. Гидрофосфат калия (K_2HPO_4).
3. L-аспарагиновая кислота ($\text{COONCH}_2\text{CHNH}_2\text{COON}$) или аспартат натрия.
4. 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4: 1,36 г дигидрофосфата калия и 2,28 г кристаллогидрата гидрофосфата калия ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 50 мл дистиллированной воды, проверяют рН и доводят дистиллированной водой объем в мерной колбе до 100 мл. Раствор стабилен при хранении в холодильнике.
5. Субстратно-буферный раствор, рН 7,4 — 0,25 М раствор L-аспарагиновой кислоты в 0,1 М фосфатном буфере: 3,3 г L-аспарагиновой кислоты или 3,9 г аспартата натрия растворяют в 40–50 мл 0,1 М фосфатного буфера, проверяют рН и доводят фосфатным буфером объем в мерной колбе до 100 мл. При использовании L-аспарагиновой кислоты к ее навеске перед растворением в фосфатном буфере для достижения рН 7,4 добавляют 20–26 мл 1 М раствора гидроксида натрия и затем проверяют рН. Раствор можно хранить в холодильнике в течение 1 мес.
6. 15 мМ раствор β-никотинамидадениндинуклеотида (динатриевая соль): 16 мг $\text{НАДН} \cdot \text{Na}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 1,5 мл дистиллированной воды. Раствор стабилен в течение 2 нед при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла. Коэффициент молярного поглощения при длине волны 340 нм — не ниже $5,6 \cdot 10^3 \text{ м}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.
7. 1 М и 5 М растворы гидроксида натрия.
8. 0,45 М раствор α-кетоглутаровой кислоты [$\text{COON}(\text{CH}_2)\text{COCOON}$]: 200 мг α-кетоглутаровой кислоты растворяют в 2,5 мл дистиллиро-

ванной воды и добавляют 0,5 мл 5 М раствора гидроксида натрия.

9. Малатдегидрогеназа (МДГ) (L-малат: NAD^+ -оксидоредуктаза; К. Ф. 1.1.1.37) из сердца свиньи. Суспензия в 50% растворе глицерина. Специфическая каталитическая активность более 17 ммоль/(с·л). Для приготовления рабочего раствора к 20 мкл суспензии добавляют 5 мл дистиллированной воды.
10. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (L-лактат: NAD^+ -оксидоредуктаза; К. Ф. 1.1.1.27) из скелетной мышцы кролика или свиньи. Суспензия в 50% растворе глицерина. Специфическая каталитическая активность не ниже 8 ммоль/(с·л). Для приготовления рабочего раствора к 40 мкл суспензии добавляют 5 мл дистиллированной воды. Раствор стабилен при хранении в холодильнике в течение 3 мес.

11. 154 мМ (изотонический) раствор натрия хлорида. Все реактивы лучше готовить на бидистиллированной воде.

Специальное оборудование. Спектрофотометр с термостатируемой кюветой.

Материал для исследования. Сыворотка крови или плазма без признаков гемолиза.

Ход определения. Перед анализом растворы реактивов и исследуемую сыворотку крови подогревают до температуры измерения.

Последовательность внесения реактивов в кювету и ход определения представлены в табл. 16.2.

Вычисляют поправку экстинкции опытной пробы с учетом контрольного опыта по формуле:

$$\left[\frac{\Delta E}{\Delta t} \right]_{\text{оп.}} - \left[\frac{\Delta E}{\Delta t} \right]_{\text{к.}} - \left[\frac{\Delta E}{\Delta t} \right]_{\text{скор.}}$$

Скорректированную величину экстинкции опытной пробы используют в дальнейших расчетах.

Расчет производят по формуле:

$$A = \frac{V_{\text{р.с.}}}{E \cdot l \cdot V_{\text{сыв.}}} \cdot \left[\frac{\Delta E}{\Delta t} \right]_{\text{скор.}}$$

где A — активность АсАТ, ммоль/(с·л); $V_{\text{р.с.}}$ — объем реакционной смеси, мл; $V_{\text{сыв.}}$ — объем сыворотки крови, взятой для анализа, мл; t — время инкубации, с; $\left[\frac{\Delta E}{\Delta t} \right]$ — изменение экстинкции пробы за 1 с; E — коэффициент молярной экстинкции НАД·Н при длине волны 340 нм, $6,22 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; l — длина оптического пути стандартной кюветы, $1 \cdot 10^{-2} \text{ м}$.

Нормальные величины: 30–420 ммоль/(с·л), или 2–25 МЕ, при 30 °С.