



Современное состояние методов ХТА и преимущество применения иммунно-химических, иммунно-ферментных и инструментальных методов экспресс анализа при острых отравлениях.

СРС

Выполнил: Марасилов И.Ж.  
Проверил: Байзолданов Т.Б.

# ПЛАН

---

- 1. Введение
- 2. Методы ХТА
- 3. ИХА, суть, преимущества
- 4. ИФА, суть, преимущества
- 5. Инструментальные методы
- 6. Литература

# ВВЕДЕНИЕ

---

ХТА представляет собой совокупность методов, применяемых для

- выделения,
- обнаружения,
- количественного определения ядовитых и сильнодействующих веществ и их метаболитов в биологических средах и в вещественных доказательствах отравления.
- Главная **задача ХТА** заключается в оказании помощи врачам клинической токсикологии в диагностике острых отравлений.

## ~~Физические и физико-химические методы анализа, применяемые в ХТА:~~

- спектрофотометрия в УФ и видимой области
- ИК-спектрометрия
- хроматография (ТСХ, ГХ, ВЭЖХ/МС)
- иммунохимические методы
- атомно-абсорбционная спектрометрия (ААС) и атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП)

# Требования к методам анализа для первичного выявления и идентификации ксенобиотиков

- Селективность
- Высокая скорость идентификации
- Отсутствие ложноотрицательных/  
ложноположительных результатов
- Требования к подготовке пользователей
- Экономичность

# БЫСТРЫЕ ТЕСТЫ

---

Необходимость в любых условиях оперативно проводить исследования дала толчок появлению быстрых тестов,

Современные быстрые тесты позволяют

- Поставить анализ без дорогостоящего оборудования
- Получить результат анализа сразу на приеме либо в течение часа
- Не требуют обязательной отправки в лабораторию
- Применяются врачами как на приеме так и на выездах и в полевых условиях

# ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ

---

Иммунологический метод анализа основан на реакции между антигеном и соответствующим ему антителом (реакция антиген – антитело)

**Антиген** - это вещество, которое чужеродное для организма животного и которое может запустить иммунную систему (защитную реакцию).

**Антитела** - это белки, которые выделяются клетками организма животного при внедрении в него антигена

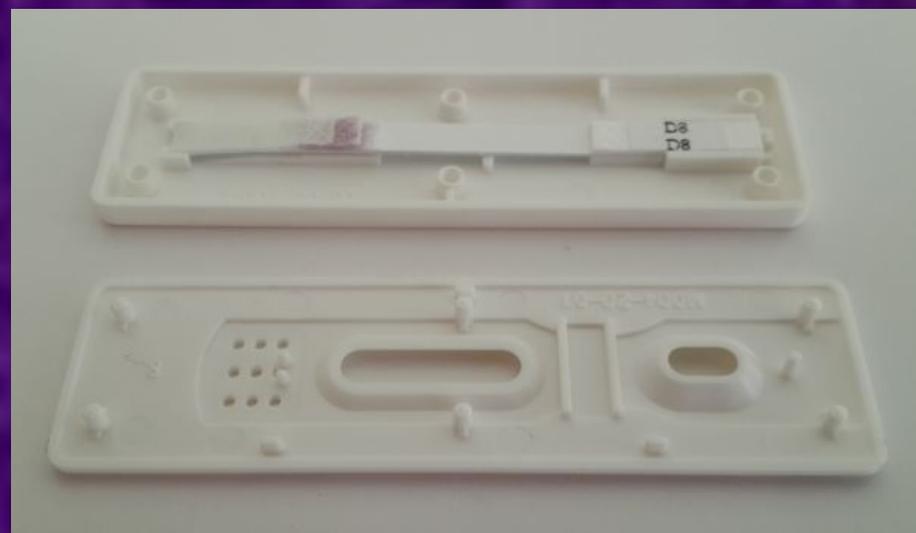
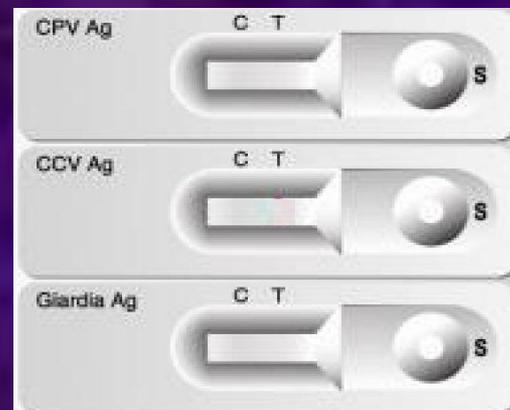
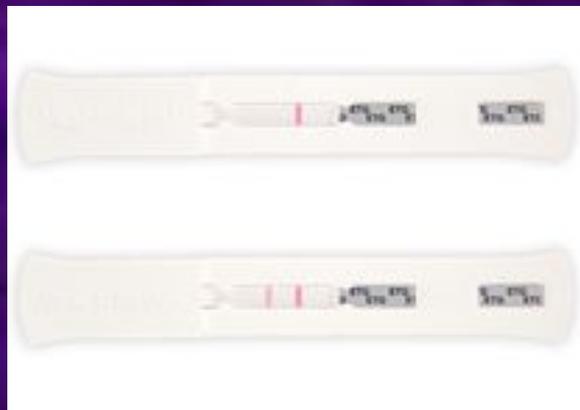
# ТИПЫ БЫСТРЫХ ТЕСТОВ

---

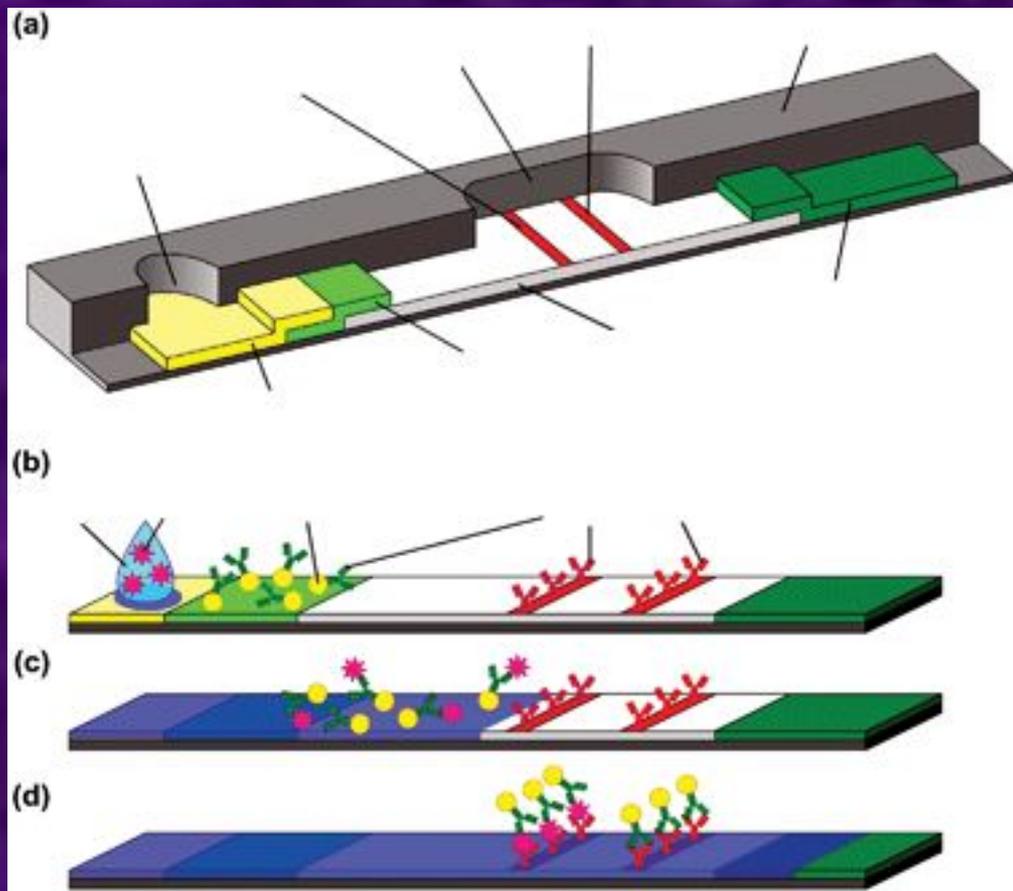
В настоящее время быстрые тесты на заболевания подразделяются на:

- Иммунохроматографические (ИХА)
- Иммуноферментные (ИФА)

# Экспресс-тесты – ИХА: внешний вид



# Что такое экспресс-тест ИХА?



- В основе теста лежит метод **иммунохроматографического анализа (ИХА)**. В результате теста происходит классическая реакция "антиген-антитело" с образованием иммунных комплексов, которые можно визуально обнаружить на тест-полоске.

**Принцип действия** состоит в том, что при погружении тест-полоски в биологическую жидкость (или другой жидкий образец), она начинает мигрировать вдоль полоски по принципу тонкослойной хроматографии. Вместе с ней движутся нанесенные на нижнюю часть тест-полоски меченые специфические антитела, которые аффинно (прочно и родственно) связываются с анализируемым веществом.

# Основными преимуществами использования иммунохроматографических тестов являются:

## Быстрота:

- Одношаговая процедура с получением результата обычно в течение 10-15-20 минут.

## Удобство:

- Простой в использовании и легкий в прочтении результатов

## Однако иммунохроматографические тест-полоски не лишены недостатков.

---

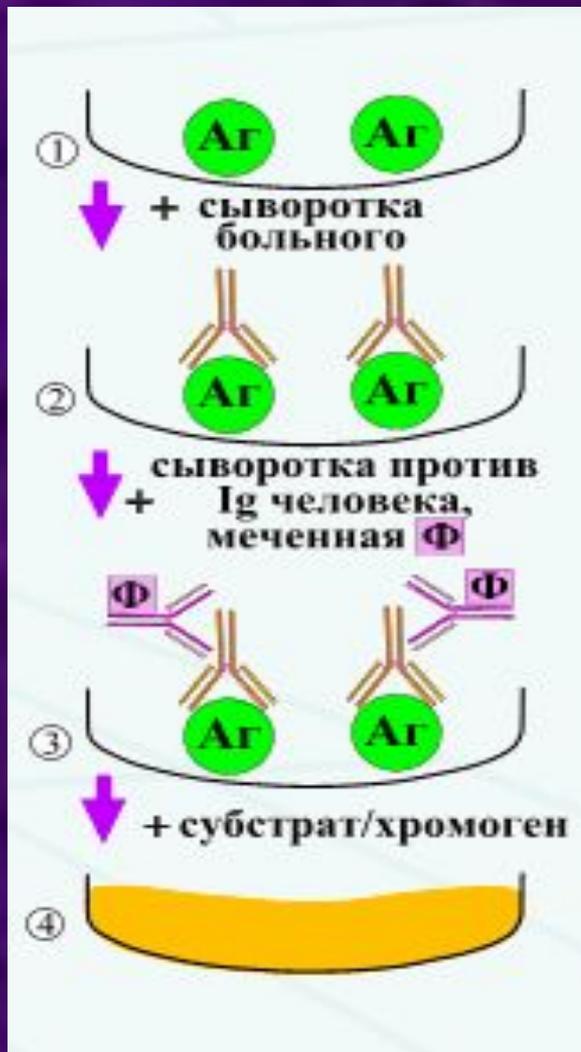
Касается это, в первую очередь, *надежности и чувствительности* тестов.

- *Надежность и чувствительность* зависит, во-первых, от качества используемых в тесте реагентов и, во-вторых, от концентрации антигена в биоматериале.
- *Качество используемых реагентов* зависит от способов их получения, очистки и фиксации на полоске.
- *Концентрация антигена* – от стадии заболевания и количества биоматериала.
- *Количество биоматериала* особенно важно при использовании цельной крови.
- Существенную роль играет *гематокрит*, т.е. соотношение плазмы и форменных элементов. *При высоком гематокрите снижается* доля элементов антигена из плазмы по сравнению с форменными элементами

## Кроме того:

- ИХА-тесты обеспечивают только **качественный результат** (да - нет), измерение концентрации невозможно. При некоторых заболеваниях, они могут быть малоинформативными (например FIP).
- Экспресс-тесты (антигенные) **«работают» только в течение ~ 3-7 дней** после заражения (только при первоначальном воздействии антигена на организм животного) ( вирусные заболевания).
- Минимальная определяемая ИХА концентрация антигена или антител сильно выше, чем у ИФА, что может давать **«ложноотрицательный»** результат на ранней стадии, поскольку уровень антигена/антител может быть **слишком низким**, чтобы обнаружить заболевание на ранней стадии.
- Большой процент **«ложноположительных»** результатов, что мешает при исследовании животных на вирусносительство.

# Что такое ИФА-анализ (ELISA) ?



Основной *отличительной чертой* иммуноферментного анализа является то, что **комплекс «антиген-антитело»** выявляется с помощью **субстрата**, который расщепляется ферментом с появлением окрашивания (ферментативное окрашивание).

При ферментативном окрашивании для достижения окраски требуется меньшее количество комплексов антиген-антитело, так как каталитические свойства ферментов позволяют действовать им в качестве усилителей: одна молекула фермента может способствовать образованию более  $1 \cdot 10^5$  молекул продукта каталитической реакции в минуту, что обуславливает высокую чувствительность ИФА.

# Основными преимуществами использования ИФА- тестов являются:

- **Иммуноферментный анализ** – более надежный и чувствительный метод для поиска антител и антигенов и оценки их концентрации.
- Обеспечивает не только качественный, но и количественный результат.
- Определяет относительный уровень титра - диагностирует болезнь, *на гораздо более низком уровне титра*, чем положительное пороговое значение в ИХА - тестах.
- Позволяет подтверждать **подозрительные случаи** заболевания, за которыми в дальнейшем может быть изменение титра.

**ИФА – анализ более точный** в определении, он позволяет не только диагностировать заболевание , но и определить его стадию и отследить динамику развития болезни.

## Однако, у классического ИФА - анализа есть свои сложности и недостатки:

---

- Длительность и сложность постановки по сравнению с ИХА – методом и невозможность количественного учета результатов без специального оборудования.
- Необходимо большое количество образцов (8-96) для постановки анализа.
- Требуется специальная подготовка специалистов
- Высокая стоимость оборудования для оснащения лаборатории.

## Преимущество ИХА -тестов с классическим ИФА:

<b>ИХА -тест</b>	<b><u>Классический ИФА</u></b>
1. Простой 2. Портативный - удобен для «полевых» исследований.	Требует аппарата для считывания результатов ИФА.
Определяет до 3 инфекций в 1 анализе	Один результат на лунку планшета
Нужно небольшое количество образцов.	Необходимо большое количество образцов.
Быстрый срок выполнения анализа.	Более длительный срок выполнения анализа.
Выполняется непосредственно ветврачом в клинике или на вызове.	Выполняется специалистом в лаборатории.

# ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

---

- Характерной чертой химико-токсикологического анализа является необходимость использования инструментальных экспресс-методов определения токсичных веществ в биологических средах организма (кровь, моча, цереброспинальная жидкость, диализирующие растворы и т.д.) в максимально короткие сроки (1-2 часа), обладающих достаточной точностью и специфичностью.
- Этим требованиям отвечают физико-химические методы инструментального экспресс-анализа: тонкослойная хроматография (ТСХ), газожидкостная хроматография (ГЖХ), спектрофотометрия (СФМ), масспектрометрия и хроматомасспектрометрия.

# МЕТОДЫ ГЖХ

---

- В лабораторной токсикологической диагностике широко используется метод ГЖХ, оптимальными особенностями которого являются **высокая специфичность и чувствительность, быстрота проведения анализа (10-15 минут), малые количества исследуемого биосубстрата, сравнительная простота выполнения и достаточная объективность полученных результатов.** С помощью этого метода возможно качественное и количественное определение ряда летучих токсичных веществ, таких как этиловый алкоголь и некоторые его суррогаты (спирты C<sub>1</sub> — C<sub>5</sub>, хлорированные углеводороды), ФОИ и др.

- **Тонкослойная хроматография** — хроматографический — хроматографический метод, основанный на использовании тонкого слоя адсорбента в качестве неподвижной фазы. Он основан на том, **что разделяемые вещества по-разному распределяются между сорбирующим слоем и протекающим через него элюентом, вследствие чего расстояние, на которое эти вещества смещаются по слою за одно и то же время, различается.** Тонкослойная хроматография предоставляет большие возможности для анализа и разделения веществ, поскольку и сорбент, и элюент могут варьироваться в широких пределах. При этом коммерчески доступен ряд пластинок с различными сорбентами, что делает возможным быстрое и рутинное использование метода. Разновидностью тонкослойной хроматографии является более надёжная и воспроизводимая **высокопроизводительная тонкослойная хроматография**, при проведении которой используются специальные пластинки и сложное оборудование.

# ЛИТЕРАТУРА

---

- <http://physiomed.com.ua>
- <https://www invitro.ru>
- <http://krasnayakrov.ru>
- <http://www.immunotek.ru>
- Байзолданов Т.Б. «Руководство по токсикологической химии ядовитых веществ, изолируемых методом экстракции» Алматы, 2003г.
- Вергейчик Т.Х. «Токсикологическая химия» Москва, 2013г.