

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
по организации самостоятельной работы обучающихся
по дисциплине «КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА»
для студентов специальности 31.05.01 «Лечебное дело »

ВВЕДЕНИЕ

Целью освоения является формирование системных знаний, профессиональных, общенаучных компетенций у будущего специалиста врача-лечебника по специальности 31.05.01 Лечебное дело по клинической лабораторной диагностике заболеваний и представлении современных возможностей лабораторных исследований; этиологии, патогенеза наиболее распространённых заболеваний; клинической лабораторной диагностики наиболее распространенных заболеваний.

Основными задачами изучения дисциплины являются:

- 1) формирование знаний о современных методах клинической лабораторной диагностики, используемых в практическом здравоохранении;
- 2) усвоение теоретико-методологических основ и практических навыков осуществления лабораторной диагностики заболеваний;
- 3) формирование профессиональных компетенций о развитии медицины в интеграции с достижениями естествознания.

Параллельно с решением основных профессиональных задач изучение клинической лабораторной диагностики: лабораторной аналитики, менеджмента качества, клинической диагностики позволяет углубить и расширить общеобразовательную эрудицию будущих врачей-биохимиков, повысить их культурно-образовательный уровень.

Методические рекомендации по изучению теоретического материала

С учетом современных научных достижений освещают задачи и вопросы методологии клинической лабораторной диагностики, основы биохимии и патофизиологии показателей обмена организма, принципы клинико-лабораторной диагностики заболеваний, проблемы лабораторной диагностики инфекционных, онкологических, иммунологических и др. заболеваний.

Раздел по частной клинической лабораторной диагностике построен по системному принципу. В нем рассматриваются группы лабораторных показателей, объединенных по патогенетическому и этиологическому принципам.

В каждой главе рассматриваются основные лабораторные показатели, имеющие клиническое значение для диагностики различных заболеваний.

Студенты, изучившие «Клиническую лабораторную диагностику», должны определять лабораторные анализы их клинико-диагностическую значимость и правильно ориентироваться в лабораторных методах диагностики различных заболеваний, делать выбор, отдавая предпочтение определенному методу диагностики, уметь оценивать результаты исследования и сформулировать заключение (поставить лабораторный диагноз) и провести дифференциальный диагноз, используя клинические и дополнительные методы исследования.

По результатам освоения дисциплины студент должен

Знать:

1. Об организации лабораторной службы в Российской Федерации
2. Основы биохимии и патофизиологии показателей обмена организма
3. Принципы клинико-лабораторной диагностики заболеваний
4. О системе гемостаза и принципах лабораторной диагностики нарушений
5. О дифференциальной диагностике заболеваний крови
6. О современных представлениях об этиологии опухолей и онкогенезе
7. О первичных и вторичных иммунодефицитах
8. О лабораторно диагностике паразитарных болезней

Уметь:

1. Оценить результат исследования и сформулировать заключение (поставить лабораторный диагноз) и провести дифференциальный диагноз, используя клинические и дополнительные методы исследования;
2. Провести анализ работы лаборатории, определить способы ее улучшения;
3. Провести расхождения лабораторного диагноза с клиническим и патологоанатомическим диагнозом, выявить ошибки и разработать мероприятия по улучшению качества диагностической работы;
4. Организовать рабочее место для проведения цитологических, биохимических, иммунологических, генетических и других исследований;
5. Определить последовательность биохимических исследований и необходимость дополнительного обследования больного;
6. Выявлять нарушения в обмене белков, углеводов, ферментов, гормонов, изменения водно-минерального, кислотно-основного состояния и др.
7. Составить программу лабораторной диагностики и дифференциации для больных при плановом обследовании и при острых состояниях;
8. Определить клинико-диагностическое значение результатов лабораторных исследований;
9. Идентифицировать в окрашенных препаратах форменные элементы крови;
10. Провести исследование гемо- и миелограммы при острых и хронических лейкозах, анемиях, опухолевых заболеваниях крови, лучевой болезни оценить полученные результаты;
11. Определить критерии эффективности лечения гематологических заболеваний;
12. Выбрать диагностическую программу, описать свойства мокроты, желудочного сока, кала, мочи, спинномозговой жидкости, отделяемого мужских и женских половых органов, транссудатов и экссудатов. Оценить полученные результаты, использовать результаты для диагностики заболеваний;
13. Диагностировать по клеточным элементам острый и хронический воспалительные процесс, предраковые состояния, гиперплазию (реактивную и опухолевую), опухоли;
14. Дифференцировать пролиферацию, дисплазию, метаплазию;
15. Определять цитологическую форму и степень дифференциации опухолей.
16. Идентифицировать в различном биологическом материале яйца гельминтов, простейшие, возбудителей кожно-венерических заболеваний и грибковых заболеваний; интерпретировать результаты биологического материала, составить программу исследования.

Владеть:

1. Специальной терминологией и навыками для самостоятельного применения полученных знаний.

Методические рекомендации по изучению теоретического материала

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала дисциплины «Клиническая лабораторная диагностика» студент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины в библиотеке СКФУ. Согласно плану-графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна отводиться на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет. Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных.

Подготовку теоретического раздела занятия необходимо начинать с ознакомления с вопросами для самоподготовки. Изучение теоретического материала должно основываться на исходном уровне знаний к теме или разделу. Необходимая учебная

информация содержится в рекомендуемых учебниках основной и дополнительной литературы

Вопросы для самоконтроля приведены в фонде оценочных средств по дисциплине.

Методические указания по подготовке доклада

Структура доклада включает в себя следующие элементы:

- титульный лист;
- оглавление;
- введение;
- основная часть;
- заключение;
- список литературы и источников;

Титульный лист – это информация о выходных данных вашей работы. Он является первой страницей работы и заполняется по строго определенным правилам. Титульный лист не нумеруется.

В оглавлении текста последовательно излагаются названия пунктов доклада с указанием страницы, с которой начинается каждый пункт. Заголовки оглавления должны точно повторять заголовки в тексте. Сокращать или давать их в другой формулировке, последовательности и соподчиненности по сравнению с заголовками в тексте нельзя. Заголовки одинаковых ступеней рубрикации необходимо располагать друг под другом. Заголовки каждой последующей ступени смещают на три–пять знаков вправо по отношению к заголовкам предыдущей ступени. Все заголовки начинают с прописной буквы без точки на конце. Последнее слово каждого заголовка соединяют отточием с соответствующим ему номером страницы в правом столбце оглавления.

Введение к работе. Здесь обычно обосновываются актуальность выбранной темы, цель и содержание поставленных задач.

Содержание глав основной части должно точно соответствовать теме доклада и полностью её раскрывать. Эти главы должны показать умение автора сжато, логично и аргументировано излагать материал. Важно понимать, что каждая глава должна представлять собой законченное произведение. Её следует начинать постановкой рассматриваемой задачи, а завершать четкими, аргументированными выводами. Все приводимые в работе данные обязательно следует сопровождать подстрочной ссылкой на источник, описание которого должно приводиться в соответствии с требованиями библиографических стандартов. Как правило, основная часть доклада состоит из 2–3 глав.

Доклад заканчивается заключительной частью, которая так и называется «заключение». Этот синтез – последовательное, логически стройное изложение полученных итогов и их соотношение с общей целью и конкретными задачами, поставленными и сформулированными во введении.

После заключения помещается библиографический список использованной литературы, куда включаются оригинальные тексты, монографические исследования, научные статьи, учебные пособия и др. Каждый включенный в такой список литературный источник должен иметь отражение в тексте доклада. Если автор доклада делает ссылку на какие-либо заимствованные факты или цитирует работы других авторов, то он должен обязательно указать в подстрочной ссылке, откуда взяты приведенные материалы. Список литературы должен включать не менее 5 источников.

Объем доклада должен составлять 10-15 страниц машинописного текста.

Тематика докладов приведена в фонде оценочных средств по дисциплине.

Общие требования к оформлению доклада

Текст доклада должен быть напечатан на одной стороне стандартного листа белой односторонней бумаги формата А4 (210×297 мм) через полтора интервала (размер шрифта – 14) с применением черных чернил с полями вокруг текста. Размер левого поля 30 мм, правого – 10 мм, верхнего – 20 мм, нижнего – 20 мм. При таких полях каждая страница

должна содержать приблизительно 1800 знаков (30 строк, по 60 знаков в строке, считая каждый знак препинания и пробел между словами также за печатный знак).

Текст перепечатывается в строго последовательном порядке. Не допускаются разного рода текстовые вставки и дополнения, помещаемые на отдельных страницах или на оборотной стороне листа, и переносы кусков текста в другие места. Все сноски и подстрочные примечания перепечатываются (через один интервал) на той странице, к которой они относятся. Все страницы нумеруются, начиная с титульного листа. Цифру, обозначающую порядковый номер страницы, ставят в правом углу верхнего поля листа (на первой и второй странице цифру, обозначающую порядковый номер, не ставят).

Студенты сдают доклад преподавателю в срок, определенный учебным планом и рабочей программой дисциплины. Сданный доклад предполагает обсуждение и защиту в учебной группе.

Рейтинговая оценка знаний

Согласно Положению об организации рейтинговой оценки знаний студентов федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «О Проведении текущего контроля успеваемости и промежуточной аттестации обучающихся по образовательным программам высшего профессионального образования в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Северо-Кавказский федеральный университет» (протокол №13 от 04.07.2013)

Форма промежуточной аттестации (зачет)

Вопросы к зачету

1. Значение, цели, задачи и место клинической лабораторной диагностики в развитии теоретической и практической медицины
2. Контроль качества лабораторных исследований - определение, система контроля качества в лабораториях, контроль качества на разных стадиях лабораторного исследования.
3. Виды контроля качества лабораторных исследований - цели, задачи, регламентирующая документация.
4. Организация внутрилабораторного контроля качества контроля качества исследований
5. Контрольные карты - назначение, принципы построения, критерии оценки Вестгарда.
6. Лабораторное обеспечение медицинской помощи
7. Объекты клинических лабораторных исследований
8. Лабораторная аналитика
9. Формы организации лабораторного обеспечения медицинской помощи
10. Оперативность получения лабораторной информации
11. Стандартизация организации лабораторного обеспечения
12. Основы медицинского страхования. Обязательное и добровольное страхование.
13. Критерии эффективности работы лабораторий
14. Аналитические характеристики методов
15. Правила установления референтных интервалов и пределов
16. Выбор отсечных точек и их влияние на характеристику информативности лабораторных исследований
17. Внешняя оценка качества клинических лабораторных исследований
18. Обеспечение сопоставимости результатов лабораторных исследований

19. Высокотехнологичные лабораторные исследования
20. Лабораторные информационные системы
21. Методы видеоцифровой регистрации
22. Иммунохимические методы анализа
23. Мультиплексный иммунный анализ
24. Молекулярная клиническая диагностика
25. Методы молекулярной диагностики
26. Преимущества методов молекулярной клинической диагностики
27. Приборное оснащение клиничко-диагностических лабораторий.
28. Методы молекулярной клинической диагностики при установлении или уточнении диагноза заболевания
29. Применение ПЦР- диагностики в различных областях медицины
30. Требования к помещениям в клиничко-диагностических лабораториях.
31. Управление лабораторной службой в учреждениях здравоохранения.
32. Правовые основы деятельности клиничко-диагностических лабораторий.
33. Функции лабораторий ЛПУ.
34. Основные документы, регламентирующие работу клиничко-диагностических лабораторий.
35. Номенклатура лабораторных исследований.
36. Требования к помещениям в клиничко-диагностических лабораториях.
37. Требования к оборудованию в клиничко-диагностических лабораториях.
38. Техника безопасности в клиничко-диагностических лабораториях.
39. Основные приборы и инструментарий в клиничко-диагностических лабораториях, уход за ними.
40. Компьютерные информационные технологии в деятельности лабораторной службы.
41. Менеджмент в деятельности лабораторной службы.
42. Квалификационные требования врача-лаборанта.
43. Международные стандарты, определяющие требования к микробиологическим лабораториям.
44. Основная документация лабораторной деятельности.
45. Международная и российская классификация лабораторий.
46. Основные формы контроля качества (внутрилабораторный, межлабораторный, международный).
47. Организация рабочих мест и техника безопасности в КДЛ.
48. Методы исследования, нормы содержания в крови, клиничко-диагностическое значение определения белковых фракций.
49. Методы определения белка в моче, клиничко-диагностическое значение.
50. Методы исследования, нормы содержания в крови, клиничко-диагностическое значение определения билирубина.
51. Методы исследования, нормы содержания в крови, клиничко-диагностическое значение определения глюкозы.
52. Методы определения глюкозы в моче, клиничко-диагностическое значение.
53. Методы исследования, нормы содержания в крови, клиничко-диагностическое значение определения креатинина.
54. Клиренс креатинина - проба Реберга. Клиничко-диагностическое значение.

55. Методы исследования, нормы содержания в крови, клинико-диагностическое значение определения мочевой кислоты.
56. Методы исследования, нормы содержания в крови, клинико-диагностическое значение определения мочевины.
57. Методы исследования, нормы содержания в крови, клинико-диагностическое значение определения гликированного гемоглобина.
58. Методы исследования, нормы содержания в крови, клинико-диагностическое значение определения мочевины.
59. Методы исследования, нормы содержания в крови, клинико-диагностическое значение определения триглицеридов, общего холестерина.
60. Методы исследования, нормы содержания в крови, клинико-диагностическое значение определения холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности. Расчет индекса атерогенности.
61. Альфа-1 антитрипсин. Альфа-1-кислый гликопротеин. Альфа-2-макроглобулин. Биологическая роль. Нормальное содержание в крови. Клинико-диагностическое значение определения.
62. Иммуноглобулины А, D, E, G, M. Методы определения, клинико-диагностическое значение.
63. Гаптоглобин. Миоглобин. Натрийуретический пептид. Тропонин. Биологическая роль. Нормальное содержание в крови. Клинико-диагностическое значение определения.
64. Калий. Физиологическая роль. Регуляция обмена в организме. Методы исследования, клинико-диагностическое значение определения.
65. Натрий. Физиологическая роль. Регуляция обмена в организме. Методы исследования, клинико-диагностическое значение определения.
66. Кальций. Физиологическая роль. Регуляция обмена в организме. Методы исследования, клинико-диагностическое значение определения.
67. Магний. Физиологическая роль. Регуляция обмена в организме. Методы исследования, клинико-диагностическое значение определения.
68. Хлор. Фтор. Иод. Физиологическая роль. Регуляция обмена в организме. Методы исследования, клинико-диагностическое значение определения.
69. Медь. Кобальт. Цинк. Физиологическая роль. Регуляция обмена в организме. Методы исследования, клинико-диагностическое значение определения.
70. Водорастворимые витамины. Биологическая роль. Нормальное содержание в организме. Клиническое значение.
71. Жирорастворимые витамины. Биологическая роль. Нормальное содержание в организме. Клиническое значение.
72. Витамин В12 (кобаламин). Фолиевая кислота. Биологическая роль. Нормальное содержание в организме. Клиническое значение.
73. Аминотрансферазы. Принципы методов исследования. Клинико-диагностическое значение определения при различных заболеваниях.
74. Щелочная и кислая фосфатазы. Принципы методов исследования. Клинико-диагностическое значение определения при различных заболеваниях.
75. Альфа-амилаза общая. Амилаза мочи. Принципы методов исследования. Клинико-диагностическое значение определения при различных заболеваниях.

76. Аминотрансферазы. Принципы методов исследования. Клинико-диагностическое значение определения при различных заболеваниях.
77. Гамма-глутамилтрансфераза. Принципы методов исследования. Клинико-диагностическое значение определения при различных заболеваниях.
78. Креатинкиназа. Принципы методов исследования. Клинико-диагностическое значение определения при различных заболеваниях.
79. Лактатдегидрогеназа. Принципы методов исследования. Клинико-диагностическое значение определения при различных заболеваниях.
80. Липаза. Трипсин. Холинэстераза. Принципы методов исследования. Клинико-диагностическое значение определения при различных заболеваниях.
81. Антистрептолизин О. Ревматоидный фактор. С-реактивный белок. Биологическая роль, нормальное содержание в крови. Клинико-диагностическое значение определения.
82. Трансферрин. Ферритин. Церулоплазмин. Биологическая роль, нормальное содержание в крови. Клинико-диагностическое значение определения.
83. Применение ПЦР- диагностики в различных областях медицины
84. Требования к помещениям в клинико-диагностических лабораториях.
85. Управление лабораторной службой в учреждениях здравоохранения.
86. Правовые основы деятельности клинико-диагностических лабораторий.
87. Функции лабораторий ЛПУ.

Критерии оценки:

Оценка «отлично» выставляется студенту, если теоретическое содержание курса освоено полностью, без пробелов; исчерпывающе, последовательно, четко и логически стройно излагает материал; свободно справляется с задачами, вопросами и другими видами применения знаний; использует в ответе дополнительный материал все предусмотренные программой задания выполнены, качество их выполнения оценено числом баллов, близким к максимальному; анализирует полученные результаты; проявляет самостоятельность при выполнении заданий.

Оценка «хорошо» выставляется студенту, если теоретическое содержание курса освоено полностью, необходимые практические компетенции в основном сформированы, все предусмотренные программой обучения учебные задания выполнены, качество их выполнения достаточно высокое. Студент твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, не допуская существенных неточностей в ответе на вопрос.

Оценка «удовлетворительно» выставляется студенту, если теоретическое содержание курса освоено частично, но пробелы не носят существенного характера, большинство предусмотренных программой заданий выполнено, но в них имеются ошибки, при ответе на поставленный вопрос студент допускает неточности, недостаточно правильные формулировки, наблюдаются нарушения логической последовательности в изложении программного материала.

Оценка «неудовлетворительно» выставляется студенту, если он не знает значительной части программного материала, допускает существенные ошибки, неуверенно, с большими затруднениями выполняет лабораторные работы, необходимые практические компетенции не сформированы, большинство предусмотренных программой обучения учебных заданий не выполнено, качество их выполнения оценено числом баллов, близким к минимальному.

ТЕСТЫ

Исследования в клинической лабораторной диагностике

Базовый уровень

1. Лицензирование медицинского учреждения представляет собой:

- А. определение соответствия качества медицинской помощи установленным стандартам;
- Б. выдачу государственного разрешения на осуществление определенных видов деятельности;
- В. процедуру предоставления медицинскому учреждению статуса юридического лица.

2. В обязанности медицинского лабораторного техника входит:

- А. подготовительная работа для производства анализов
- Б. взятие капиллярной крови для исследования
- В. регистрация поступающего в лабораторию биоматериала для исследования
- Г. стерилизация лабораторного инструментария
- Д. все перечисленное верно

3. Обязанностями медицинского лабораторного техника и лаборанта являются:

- А. соблюдение правил техники безопасности
- Б. ведение необходимой документации
- В. участие в занятиях, проводимых для среднего медицинского персонала
- Г. все перечисленное верно

4. Инструктаж по технике безопасности работы в лаборатории должен проводиться не реже 1 раза в:

- А. месяц
- Б. 0,5 год
- В. 1 год
- Г. периодичность не нормирована

5. Ядовитые вещества подлежат предметно-количественному учету:

- А. в прошнурованных книгах
- Б. в книгах скрепленных печатью и подписью руководителя
- В. по форме учета - приход, расход, остаток
- Г. все перечисленное верно

6. В районе деятельности клинико-диагностической лаборатории для характеристики нормы нужно ориентироваться на значения:

- А. приведенные в инструкциях к использованным наборам
- Б. референтные значения контрольных сывороток
- В. приведенные в бланке КДЛ ЛПУ
- Г. любого из перечисленных источников

7. На результаты анализа могут повлиять следующие факторы внелабораторного характера :

- А. циркадные ритмы, влияние климата
- Б. положение тела
- В. прием медикаментов
- Г. все перечисленные

8. Сходимость измерения - это качество измерения, отражающее:

- А. близость результатов к истинному значению измеряемой величины
- Б. близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях
- В. близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях
- Г. близость к нулю систематических ошибок в их результатах
- Д. все перечисленное

9. Поверка средств измерений:

- А. определение характеристик средств измерений любой организацией имеющей более точные измерительные устройства чемверяемое.
- Б. калибровка аналитических приборов по точным контрольным материалам.
- В. совокупность операций, выполняемых органами государственной метрологической службы с целью определения и подтверждения соответствия средства измерений установленным техническим требованиям
- Г. совокупность операций, выполняемых, организациями с целью определения и подтверждения соответствия средства измерений современному уровню.
- Д. все перечисленное верно.

10. Наиболее часто внутрилабораторные погрешности связаны :

- А. с низкой квалификацией персонала
- Б. с недобросовестным отношением к работе
- В. с неправильными расчетами, ошибками при приготовлении реактивов
- Г. с использованием устаревшего оборудования, малочувствительных, неспецифических методов
- Д. все перечисленное верно

11. Основное требование межлабораторного контроля качества:

- А. анализ контрольных проб проводится отдельно от анализируемых проб
- Б. анализ контрольных проб проводится заведующим лабораторией
- В. анализ контрольных проб включается в обычный ход работы лаборатории
- Г. проводится любым лаборантом
- Д. все перечисленное верно

12. При взятии материала от пациента для лабораторного анализа необходимо учитывать :

- Б. обеспечение достаточного для исследования количества материала
- В. соотношение кровь/антикоагулянт
- Г. время взятия материала
- Д. все перечисленное

13. Для приготовления 5 л 3 % раствора хлорамина необходимо взять хлорамина (г.):

- А. 150
- Б. 15
- В. 100
- Г. 115

14. Посуду с биоматериалом инфицированных больных :

- А. обеззараживают автоклавированием
- Б. обрабатывают дезинфицирующим раствором
- В. обрабатывают кипячением
- Г. все перечисленное верно

15. Источником ошибок при подсчете эритроцитов в камере Горяева могут служить:

- А. подсчет клеток ранее, чем через одну минуту после заполнения камеры
- Б. образование сгустка, поглотившего часть клеток
- В. меньшее количество сосчитанных квадратов, гемолиз эритроцитов
- Г. неправильное притирание покровных стекол
- Д. все перечисленное

1. Для выявления зернисто-сетчатой субстанции ретикулоцитов рекомендуется краситель:

- А. бриллиант-крезиловый синий
- Б. азури 1
- В. азури 2
- Г. метиленовый синий
- Д. все перечисленные

17. Для окраски мазков крови применяются методы:

- А. по Паппенгейму
- Б. по Романовскому
- В. все перечисленные методы
- Г. ни один из перечисленных

18. Гемоглобин выполняет функцию :

- А. пластическую
- Б. транспорта кислорода и углекислоты
- В. энергетическую
- Г. транспорта микроэлементов

19. Наиболее точным методом определения гемоглобина является:

- А. определение карбоксигемоглобина
- Б. цианметгемоглобиновый метод
- В. определение метгемоглобина
- Г. все методы равнозначны

20. Анизоцитоз - это изменение :

- А. количества эритроцитов
- Б. содержания гемоглобина в эритроците
- В. размера эритроцита
- Г. всех перечисленных параметров

21. Высокий цветовой показатель отмечается при:

- А. фолиеводефицитной анемии
- Б. наследственном отсутствии транскабаламина
- В. всех перечисленных заболеваний
- Г. ни при одном из перечисленных

22. Среднее содержание гемоглобина в эритроците повышено при:

- А. при сфероцитозе
- Б. железодефицитной анемии
- В. анемии при хроническом воспалении
- Г. все перечисленное верно
- Д. все перечисленное неверно

23. Показатель RDW, регистрируемый гематологическими анализаторами, отражает изменение:

- А. количества эритроцитов
- Б. насыщения эритроцитов гемоглобином
- В. различия эритроцитов по объему (анизоцитоз)
- Г. количества лейкоцитов в крови

24. Гранулоциты образуются в:

- А. костном мозге
- Б. лимфатических узлах
- В. селезенке и лимфатических узлах
- Г. печени

25. Тромбоциты образуются в:

- А. костном мозге
- Б. лимфатических узлах
- В. все ответы правильные
- Г. правильного ответа нет

Повышенный уровень

26. Под "относительным нейтрофилезом" понимают:

- А. увеличение процентного содержания нейтрофилов при нормальном абсолютном их количестве
- Б. увеличение процентного и абсолютного содержания нейтрофилов
- В. увеличение их абсолютного числа
- Г. уменьшение процентного содержания нейтрофилов
- Д. все ответы неправильные

27. Абсолютное увеличение количества базофилов в периферической крови характерно для:

- А. хронических миелопролиферативных заболеваний
- Б. аллергических состояний
- В. лечения эстрогенами
- Г. все перечисленное верно

28. Бластные клетки имеют ядерно-цитоплазматическое соотношение :

- А. в пользу ядра
- Б. значения не имеет
- В. разное соотношение
- Г. правильного ответа нет

29. Для подсчета тромбоцитов может быть использован любой из перечисленных методов,

к р о м е :

- А. в мазках крови
- Б. в камере Горяева
- В. на гематологическом анализаторе
- Г. тромбоэластограммы

30. Для распада первичного туберкулезного очага характерны :

- А. кристаллы гематоидина

- Б. спирали Куршмана
- В. скопления эозинофилов
- Г. обызвествленные эластические волокна

31. Для грибов, выявляемых в мокроте при аспиргиллезе, характерны :

- А. тонкий, несептированный мицелий
- Б. септированный мицелий
- В. конидиальное спороношение в виде кисточки
- Г. все перечисленное

32. В мокроте при бронхитах обнаруживают следующие элементы, к р о м е :

- А. эритроцитов
- Б. цилиндрического эпителия
- В. эластических волокон
- Г. альвеолярных макрофагов

33. Структурно-функциональной единицей печени является :

- А. печеночная долька
- Б. купферовская клетка
- В. все ответы неправильные
- Г. все ответы правильные

34. Функцией печени является :

- А. гемопоэтическая
- Б. экскреторная
- В. синтетическая
- Г. все перечисленные

Базовый уровень

35. Цитологическое исследование нативного препарата, приготовленного из слизи, обнаруженной в желчи, проводят :

- А. через 2-3 часа
- Б. через 5-10 минут
- В. немедленно
- Г. правильного ответа нет

36. Для цитологического исследования желчи препарат готовят из:

- А. хлопьев слизи
- Б. осадка со дна пробирки
- В. всего перечисленного
- Г. правильного ответа нет

37. Черную окраску кала обуславливает :

- А. билирубин
- Б. кровотечение из прямой кишки
- В. прием карболена
- Г. все перечисленное

38. Наиболее чувствительной пробой на кровь в кале является :

- А. пиридоновая проба
- Б. ортотолуидиновая проба
- В. бензидиновая проба

Г. все перечисленные

39. Почки осуществляют регуляцию :

- А. электролитного состава внутренней среды
- Б. эритропоэза
- В. кислотно-основного состояния
- Г. всего перечисленного

40. При 3-х стаканной пробе наличие крови в 1 стакане свидетельствует о кровотечении из :

- А. верхних мочевыводящих путей
- Б. уретры
- В. мочевого пузыря
- Г. любого из перечисленных отделов

41. Нормальная суточная экскреция эритроцитов с мочой по методу Каковского-Аддиса допускает до :

- А. 1 млн
- Б. 2 млн
- В. 3 млн
- Г. 4 млн
- Д. 10 млн

42. Ураты в осадке мочи растворяются :

- А. теплой дистиллированной водой
- Б. раствором Люголя
- В. добавлением кислоты
- Г. центрифугированием и фильтрованием
- Д. добавлением эфира

43. Моча приобретает фруктовый запах при :

- А. диабетической коме
- Б. застойной почке
- В. нефротическом синдроме
- Г. цистите

44. Реакционная зона «нитриты» на тест-полосках «сухая химия» для исследования мочи выявляет:

- А. белок в моче
- Б. микроальбуминурию
- В. бактериурию
- Г. примесь крови в моче

45. Цилиндрурия (3-5 цилиндров в поле зрения) наблюдается при :

- А. нефрите, нефрозе
- Б. гепатите
- В. цистите
- Г. сахарном диабете
- Д. уретрите

46. Определение относительной плотности мочи дает представление о :

- А. концентрационной функции

- Б. фильтрационной функции
- В. всех перечисленных функциях
- Г. ни одной из перечисленных

47. При заболеваниях почек с преимущественным поражением клубочков отмечается :

- А. снижение фильтрации
- Б. нарушение реабсорбции
- В. нарушение секреции
- Г. нарушение всех перечисленных функций

48. Жировые цилиндры встречаются при :

- А. почечном кровотечении
- Б. амилоидозе почки
- В. пиелонефрите
- Г. липоидном нефрозе

49. Причиной анурии могут быть следующие заболевания, кроме : :

- А. тяжелые отравления
- Б. перитонит
- В. мочекаменная болезнь
- Г. сахарный диабет

50. Между количеством глюкозы в моче и степенью полиурии :

- А. существует параллелизм
- Б. не существует параллелизм
- В. имеется обратная зависимость
- Г. все перечисленное верно
- Д. правильного ответа нет

51. При остром цистите характерно преобладание в осадке мочи :

- А. лейкоцитов
- Б. почечного эпителия
- В. переходного эпителия
- Г. плоского эпителия

52. Функции яичников:

- А. обеспечивают овуляцию
- Б. влияют на развитие вторичных половых признаков
- В. все перечисленные.
- Г. ни одна из перечисленных

53. В выпотную жидкость, полученную при пункции, для предупреждения свертывания добавляют:

- А. гепарин
- Б. щавелевокислый натрий
- В. ЭТА-Na
- Г. любой из перечисленных растворов

54. Шприц для аспирационной диагностической пункции следует обрабатывать:

- А. обезжириванием спиртом и эфиром
- Б. мыльным раствором

- В. сухожаровой стерилизацией
- Г. правильно Б и Г

55. Краску Романовского следует готовить на забуференной воде, так как :

- А. улучшается проникновение краски в форменные элементы крови
- Б. поддерживается рН среды при окраске
- В. капля предохраняется от смывания
- Г. предупреждается выпадение красителя в осадок

56. После ополаскивания окрашенного препарата водой смылась толстая капля крови. Это могло быть связано с тем, что :

- А. промывание капли велось осторожно
- Б. капля была сделана очень толстой
- В. капля была очень тонкой
- Г. все ответы правильные

57. У ребенка в кале обнаружены округлой формы бесцветные, прозрачные яйца с двухконтурной оболочкой. Между наружной и внутренней оболочкой видны извивающиеся нити-филаменты. В центре расположены 3 пары крючьев. Обнаруженные яйца относятся к :

- А. власоглаву
- Б. бычьему цепню
- В. карликовому цепню
- Г. все перечисленное верно

58. Наиболее частой причиной гемолитической болезни новорожденных являются антитела к :

- А. антигенам системы-резус
- Б. антигенам М, Даффи, Келл
- В. все перечисленное верно
- Г. все перечисленное неверно

59. При определении групповой принадлежности крови необходимо соблюдать все следующие условия, к р о м е :

- А. соотношения капель крови и стандартной сыворотки
- Б. использования негемолизированной крови
- В. покачивания плоскости, на которой ведется исследование
- Г. использования стандартных сывороток с низким титром

Повышенный уровень

60. В основе определения резус-принадлежности крови лежит реакция:

- А. агглютинации
- Б. преципитации
- В. иммунодиффузии
- Г. агрегации
- Д. опсонизации

61. Для исследования групповой и резус-принадлежности можно брать кровь :

- А. без стабилизатора
- Б. взвесь эритроцитов
- В. все ответы правильные

62. В качестве биологического материала для лабораторного исследования может использоваться :

- А. почечные камни
- Б. сперма
- В. желчь
- Г. все перечисленное

63. Мешающим фактором (интерференция) для получения правильного биохимического результата может быть :

- А. гемолиз
- Б. иктеричность (высокий билирубин)
- В. действие лекарственных препаратов
- Г. все перечисленное

64. Какие из перечисленных соединений синтезируются в печени ?

- А. креатинин
- Б. миоглобин
- В. мочевины
- Г. гемоглобин

65. Взятие венозной крови для биохимических исследований включает следующие общие правила:

- А. взятие крови натощак
- Б. создание в вене минимального стаза
- В. шприцом, которым введено лекарственное вещество
- Г. тонкой иглой с острым концом
- Д. сухой иглой

66. При взятии крови активность ферментов может меняться в результате:

- А. использовании железной иглы
- Б. травматического повреждения тканей
- В. активации системы гемостаза
- Г. всего перечисленного

67. При панкреатитах в сыворотке повышается :

- А. глутаматдегидрогеназа
- Б. ГГТП
- В. щелочная фосфатаза
- Г. липаза

Базовый уровень

68. В свежезятой сыворотке крови прежде всего нужно исследовать активность :

- А. кислой фосфатазы
- Б. трансаминаз
- В. всех перечисленных ферментов
- Г. ни одного из перечисленных ферментов

69. Основным органом, участвующим в гомеостазе глюкозы крови, является:

- А. скелетные мышцы
- Б. печень
- В. легкие

Г. почки

70. Содержание глюкозы в цельной крови при стоянии при комнатной температуре без стабилизатора :

- А. не меняется
- Б. исчезает
- В. снижается
- Г. возможен любой вариант

71. Мутность сыворотки обусловлена избытком:

- А. фосфолипидов
- Б. триглицеридов
- В. жирных кислот
- Г. простагландинов

72. На уровень холестерина крови влияют :

- А. возраст
- Б. гормональный статус
- В. характер питания
- Г. все перечисленное

73. Нарушение водного баланса может сопровождаться изменением:

- А. Гемоглобина
- Б. кислотно-щелочного равновесия
- В. общего белка
- Г. всего перечисленного

74. Гамма-глобулины снижаются при:

- А. гастрите
- Б. лучевой болезни
- В. легкими
- Г. всеми перечисленными органами

75. Физиологическими функциями белков плазмы крови являются следующие, кроме :

- А. транспортная
- Б. обеспечение гуморального иммунитета
- В. обеспечение клеточного иммунитета
- Г. поддержание коллоидного давления

76. Потеря биологической активности белка происходит при:

- А. хроматографии на природных носителях
- Б. электрофорезе
- В. денатурации
- Г. Лиофилизации

77. Диспротеинемии это :

- А. уменьшение общего белка
- Б. снижение фибриногена
- В. нарушение соотношения фракций белков плазмы
- Г. все перечисленное верно

78. Причины развития гипопротеинемии.

- А. голодание
- Б. патология печени
- В. гастроэнтеропатии
- Г. все ответы правильные

79. Причиной железодефицитной анемии может быть :

- А. нарушение синтеза порфиринов
- Б. дефицит фолиевой кислоты
- В. нарушение секреторной активности желудка
- Г. недостаток ферритина

80. Нормальный баланс железа нарушают :

- А. беременность
- Б. резекция желудка
- В. блокада синтеза порфиринов
- Г. все перечисленные факторы

81. Какой фермент является специфичным для острого панкреатита ?

- А. ЛДГ
- Б. липаза
- В. альдолаза
- Г. креатинкиназа

82. При инфаркте миокарда в крови повышается активность :

- А. ЛДГ
- Б. креатинкиназа
- В. МВ-фракция креатинкиназы
- Г. все ответы правильные

83. При какой желтухе происходит полное обесцвечивание кала ?

- А. лекарственный гепатит
- Б. обтурационная (механическая)
- В. семейная негемолитическая
- Г. все ответы правильные

84. Условие правильной фотометрии :

- А. адекватный подбор светофильтра
- Б. оптимальная температура измерения
- В. измерение холостой пробы (бланка)
- Г. все ответы правильные

85. Гипогликемия характерна для ?

- А. инсулиномы
- Б. язвенной болезни желудка
- В. ожирения
- Г. все ответы правильные

86. Алкалоз характеризуется :

- А. уменьшением концентрации OH^- в крови
- Б. увеличением лактата в крови
- В. повышением рН крови

Г.повышением концентрации H^+ крови

87. Система гемостаза включает :

- А. плазменные факторы
- Б. антикоагулянты
- В. тромбоциты
- Г. все перечисленное

88. В направлении на коагулологическое исследование необходимо указать:

- А. клинический диагноз
- Б. наличие геморрагических или тромботических проявлений
- В. проводимое лечение
- Г. все перечисленное верно

89. Группа риска при ВИЧ-инфекции:

- А. наркоманы
- Б. все перечисленные группы

90. Ошибка при исследовании гемостаза может возникнуть из-за :

- А. присутствия гепарина
- Б. неправильного соотношения антикоагулянта и крови
- В. нестабильной температуры
- Г. все перечисленное верно

91. Группа риска при ВИЧ-инфекции:

- А. наркоманы
- Б. все перечисленные группы

92. Источником инфекции ВИЧ может быть :

- А. ВИЧ-инфицированный человек
- Б. здоровые родственники больного СПИД
- В. домашние животные
- Г. насекомые
- Д. все ответы правильные

Повышенный уровень

93. Какие биологические жидкости наиболее опасны в эпидемиологическом отношении инфекции ВИЧ ?

- А. кровь
- Б. моча
- В. слюна
- Г. пот
- Д. все ответы правильные

94. Вирусный гепатит А передается :

- А. контактно-бытовой
- Б. при гемотрансфузиях
- В. от матери к ребенку
- Г. при сексуальных контактах
- Д. всеми перечисленными путями

95. Чем обрабатываются руки при попадании на них биологических жидкостей и крови больного

- А. Вымыть руки с мылом
- Б. 3 % раствором хлорамина
- В. 3 % перекисью водорода
- Г. 2 % перекисью водорода в 70° спирте

96. Можно ли использовать имеющиеся в паспорте, обменной карте и т.д. данные о групповой и резус принадлежности при переливании крови больному без предварительной проверки ?

- А. можно
- Б. можно при согласии родственников
- В. можно по жизненным показаниям

97. Причиной образования фибринозной пленки при стоянии ликвора является :

- А. примесь бактерий, попавших из воздуха
- Б. высокая активность плазмينا в ликворе
- В. выпадение в осадок фибрина, образующегося при экссудации белков в ликворные пути
- Г. все перечисленные факторы

98. К необходимым исследованиям ликвора относятся :

- А. определение белка
- Б. цитоз
- В. дифференциация клеточных элементов ликвора
- Г. все перечисленное верно

99. При работе в лаборатории, проводящей паразитологические исследования, с целью дезинфекции применяют :

- А. растворы карболовой кислоты
- Б. растворы хлорамина
- В. кипячение
- Г. все перечисленное

100. Бактериальный вагиноз характеризуется следующими признаками :

- А. щелочная реакция выделений ($\text{pH} > 4,5$)
- Б. «аммиачный» запах при проведении пробы с 10 % раствором КОН
- В. наличие «кремообразного» отделяемого в заднем своде влагалища
- Г. все перечисленное

Критерии оценивания компетенций

Оценка «отлично» выставляется студенту, если из 100% вопросов он правильно ответит на 85-100% вопросов.

Оценка «хорошо» выставляется студенту, если из 100% ответов студент правильно ответит на 70-85% вопросов

Оценка «удовлетворительно» выставляется студенту, если из 100% вопросов он правильно ответит на 55-70% вопросов.

Оценка «неудовлетворительно» выставляется студенту, если студент из 100% вопросов ответит менее чем на 55%

2. Описание шкалы оценивания

Максимально возможный балл за весь текущий контроль устанавливается равным 55. Текущее контрольное мероприятие считается сданным, если студент получил за него не менее 60% от установленного для этого контроля максимального балла. Рейтинговый балл, выставляемый студенту за текущее контрольное мероприятие, сданное студентом в установленные графиком контрольных мероприятий сроки, определяется следующим образом:

Уровень выполнения контрольного задания	Рейтинговый балл (в % от максимального балла за контрольное задание)
Отличный	100
Хороший	80
Удовлетворительный	60
Неудовлетворительный	0

Ключ к тестовым заданиям

1. - Б	2. - Д	3. - Г	4. - В	5. - Г	6. - В	7. - Г	8. - Б	9. - В	10. - Д
11. - В	12. - Д	13. - Б	14. - Г	15. - Д	16. - А	17. - В	18. - Б	19. - Б	20. - В
21. - В	22. - А	23. - В	24. - А	25. - А	26. - А	27. - А	28. - А	29. - Г	30. - Г
31. - В	32. - В	33. - А	34. - Г	35. - В	36. - А	37. - В	38. - Б	39. - Г	40. - Б
41. - А	42. - А	43. - А	44. - В	45. - А	46. - А	47. - А	48. - Г	49. - Г	50. - А
51. - А	52. - В	53. - Г	54. - В	55. - Б	56. - Г	57. - В	58. - А	59. - Г	60. - А
61. - В	62. - Г	63. - Г	64. - В	65. - А	66. - Г	67. - Г	68. - А	69. - Б	70. - В
71. - Б	72. - Г	73. - Г	74. - Б	75. - В	76. - В	77. - Б	78. - Д	79. - Г	80. - Г
81. - Б	82. - Г	83. - Б	84. - Г	85. - А	86. - В	87. - Г	88. - Г	89. - Б	90. - Г
91. - Б	92. - А	93. - А	94. - А	95. - А	96. - В	97. - В	98. - Г	99. - Г	100. - Г

Рекомендуемая литература и интернет-ресурсы

Основная литература

1. Анализы крови и мочи в клинической диагностике / А. С. Марина, Ю. В. Наточин. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2022. — 159 с.
2. Гематология: руководство для врачей / под. Ред. Н.Н. Мамаева. – 3-е изд., доп. И испр. – СПб.: СпецЛит, 2021. – 639с.
3. Кровь и лимфа. Кроветворение : учебное пособие / Л. Р. Мутушвили, О. Б. Жданова, И. И. Окулова [и др.]. — Киров : Кировский ГМУ, 2021. — 121 с.
4. Клиническая лабораторная диагностика : учебное пособие / А. А. Кишкун. - 2-е изд., перераб. и доп. - М. :
5. Клиническая лабораторная диагностика. Учебник / А.А. Кишкун, Л.А. Беганская – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2023. – 523с.
6. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. – Москва-Тверь: Изд-во «Триада», 2021. – 434с.

8.1.2. Перечень дополнительной литературы:

1. Медицинская аппаратура. Полный справочник [Электронный ресурс] / М. Ю. Ишманов, С. А. Попов, С. А. Попович [и др.]. — Электрон. текстовые данные. — Саратов: Научная книга, 2019. — 399 с. 978-5-9758-1838-6. —
2. Лабораторные исследования в клинической биохимии. Методические рекомендации для специалистов по клинической лабораторной диагностики. – Ст. 2023. - 129 с.
3. Миронова И.И., Романова Л.А., Долгов В.В. Общеклинические исследования: моча, кал, ликвор, эякулят. М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2022. – 206 с.

4. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / Под ред. Проф. М.А. Базарновой, 2020. – 318 с
5. www.clinlab.info – сайт для врачей клинической лабораторной диагностики
6. www.ramld.ru – Российская Ассоциация медицинской лабораторной диагностики
7. www.rosminzdrav.ru – Министерство здравоохранения Российской Федерации

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине «КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА»
для студентов специальности 31.05.01 «Лечебное дело»

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. Лабораторное обеспечение медицинской помощи. Организация работы в клиничко-диагностических лабораториях.

Цель работы: Ознакомить студентов с нормативной документацией врача КДЛ
Служба клинической лабораторной диагностики является совокупностью клиничко-диагностических лабораторий - подразделений учреждений здравоохранения, организованных и действующих в соответствии с едиными научно-методическими принципами.

В зависимости от структуры, профиля и мощности организаций здравоохранения в их составе функционируют КДЛ: общего типа, централизованные, специализированные
КДЛ общего типа предназначены для выполнения рутинных (ординарных) лабораторных исследований – гематологических, биохимических, общеклинических и некоторых других с целью постановки диагноза заболевания, оценки тяжести его течения, прогноза и эффективности проводимой терапии.

Централизованные КДЛ преследуют решение таких задач, как проведение наиболее сложных и трудоемких лабораторных исследований; освоение и внедрение новых методов; проведение мероприятий по повышению качества лабораторных исследований; наиболее рациональное (экономное и эффективное) использование лабораторной техники, дорогостоящих реактивов и кадров специалистов.

Специализированные КДЛ, как правило, входят в состав специализированных учреждений: эндокринологических, кардиологических, онкологических, аллергологических и других.

Министерство здравоохранения РФ Положение о клиничко-диагностической лаборатории лечебно-профилактического учреждения и централизованной клиничко-диагностической лаборатории

- Клиничко-диагностическая лаборатория (в дальнейшем - КДЛ) является диагностическим подразделением лечебно-профилактического учреждения (ЛПУ) и создается на правах отделения.
- Централизованные КДЛ создаются по указанию соответствующих территориальных органов управления здравоохранением для выполнения как различных видов исследований, так и одного их вида: биохимические, иммунологические, цитологические, микробиологические и другие исследования (специализированные лаборатории).
- Организационная структура и порядок финансирования централизованных КДЛ устанавливается органом управления здравоохранением с учетом выполняемых ими задач и в соответствии с договором об участии лабораторий в осуществлении территориальных медицинских программ.
- КДЛ, независимо от подчиненности и формы собственности, должна иметь сертификат на избранный вид деятельности.
- Руководство КДЛ осуществляет заведующий, назначаемый и освобождаемый от должности руководителем учреждения здравоохранения в установленном порядке.
- Деятельность КДЛ регламентируется соответствующими нормативными документами и настоящим положением.
- Штаты КДЛ устанавливаются в соответствии с действующими нормативными документами с учетом местных условий или рассчитываются в соответствии с объемом работы.
- Оснащение КДЛ осуществляется в соответствии с профилем и уровнем лечебно-профилактического учреждения.
- КДЛ размещается в специально оборудованных помещениях, полностью соответствующих требованиям правил по устройству, эксплуатации и техники безопасности.

- Нагрузка персонала определяется задачами лаборатории, положением о его функциональных обязанностях, а также расчетными нормами времени на проведение лабораторных исследований.
- КДЛ, независимо от подчиненности и формы собственности, должна иметь сертификат на избранный вид деятельности
- Штаты КДЛ устанавливаются в соответствии с действующими нормативными документами с учетом местных условий или рассчитываются в соответствии с объемом работы (приложение 12 к Приказу МЗ РФ №380)
- Оснащение КДЛ осуществляется в соответствии с профилем и уровнем лечебно-профилактического учреждения (приложение 8 к Приказу МЗ РФ №380)

Перечень документов, наличие которых обязательно для выполнения работ в КДЛ

- 1. Паспорт клинико-диагностической лаборатории, состоящий из титульного листа и следующих форм (таблиц):
 - 1. Перечень выполняемых в КДЛ исследований.
 - 2. Сведения об имеющихся средствах измерения (аппаратуре).
 - 3. Сведения об имеющемся вспомогательном оборудовании.
 - 4. Сведения об имеющихся стандартных контрольных материалах.
 - 5. Сведения о мерной посуде, применяемой в клинико-диагностической лаборатории.
 - 6. Сведения о штатном обеспечении и кадровом составе КДЛ.
 - 7. Сведения о помещениях клинико-диагностической лаборатории.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Спектр лабораторных исследований, выполняемых КДЛ. Ведение документации в КДЛ.
2. Порядок работы иммунологической лаборатории. Материально-техническое оснащение, спектр лабораторных исследований иммунологической лаборатории.
3. Порядок работы серологической лаборатории. Материально-техническое оснащение, спектр лабораторных исследований.
4. Цели и задачи иммунологической лаборатории, методики выполнения анализов в иммунологической лаборатории, ведение документации.
5. *Цели и задачи серологической лаборатории, методики выполнения анализов, ведение документации.*
6. *Порядок работы ПЦР-лаборатории. Материально-техническое оснащение. Спектр лабораторных исследований.*
7. *Ведение документации в ПЦР-лаборатории, методики выполнения анализов, выполнение требований биологической безопасности.*
8. *Методики выполнения анализов в биохимической лаборатории, ведение документации.*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. Контроль качества исследований. Организационные основы работы КДЛ. Номенклатура лабораторных анализов. Организация рабочих мест в КДЛ.

Цель занятия: Проведение контроля качества исследований в клинической лабораторной диагностике

Стадия I (вводная): оценка внутрисерийной воспроизводимости методики.

На данной стадии проводится проверка соответствия внутрисерийной воспроизводимости методики установленным нормам точности. С этой целью

проводится **10 измерений** определяемого показателя **в одном и том же материале** (контрольный материал или проба пациента со значением определяемого показателя в нормальном диапазоне) **в одной и той же аналитической серии**. Из полученных 10 результатов по формулам 2-4 рассчитывается коэффициент внутрисерийной вариации методики (CV_{BC}) и проверяется, что он не превышает половины предельно допустимого значения коэффициента общей аналитической вариации для 10 измерений (CV_{10} в таблице 1 Приложения 3), т.е. выполняется неравенство:

$$CV_{BC} \leq 0,5 \cdot CV_{10}, \quad (5)$$

Если это неравенство не выполняется, т.е. коэффициент внутрисерийной вариации методики составляет больше половины предельно допустимого значения коэффициента общей аналитической вариации, следует провести работу по снижению внутрисерийной вариации данной методики или выбрать другую методику определения данного показателя с лучшей внутрисерийной воспроизводимостью.

Если внутрисерийная вариация методики отвечает установленным нормам, переходят к следующей стадии.

Стадия 2 (вводная): оценка смещения и коэффициента общей аналитической вариации методики, построение контрольной карты.

На данной стадии одновременно решаются две задачи:

- во-первых, оценивается соответствие величин систематической погрешности (смещения) и коэффициента общей аналитической вариации методики установленным нормам, т.е. окончательно решается вопрос о возможности ее использования для целей лабораторной диагностики, и
- во-вторых, для каждого из двух (одного) контрольных материалов, предназначенных для использования на третьей стадии, создается контрольная карта (диаграмма) – основной инструмент внутрилабораторного контроля качества количественных исследований.

Для решения первой задачи выполняют следующее:

1. В 10 аналитических сериях измеряют значение определяемого показателя, выполняя по 1 измерению в каждой серии одновременно в двух неаттестованных контрольных материалах, выбранных для оперативного (межсерийного) контроля, и в двух аттестованных контрольных материалах.
2. Указанные 10 серий рекомендуется выполнять по одной в день. При необходимости сократить период их выполнения (например, из-за ограниченного срока годности реактивов, приготовленных из готового набора) допускается проведение по 2-3 серии в день (например, утром, днем, вечером).
3. По 10 результатам, полученным для каждого из двух аттестованных материалов, с использованием формулы 1 рассчитывают соответственно две величины относительного смещения (B_{10}).
4. По 10 результатам, полученным для каждого из двух неаттестованных материалов, с использованием формул 2-4 рассчитывают соответственно два значения коэффициента общей аналитической вариации (CV_{10}).
5. Проверяют, что полученные значения B_{10} и CV_{10} не превышают их предельно допустимые значения, приведенные в таблице 1 Приложения 3 данного документа. Если последнее выполняется, переходят к выполнению следующего шага (пункт 6). В случае превышения одной одним из полученных значений B_{10} или CV_{10} соответствующих или обеими величинами B_{10} и/или CV_{10} предельно допустимых значений проводят работу по устранению источников повышенных смещения и/или вариации или избирают другую методику определения данного показателя (с более высокими аналитическими характеристиками), после чего выполняют пункты 1-4 заново.
6. Таким же образом, как описано в пункте 1, выполняют измерения в 10 дополнительных аналитических сериях.

7. Для каждого аттестованного материала по 20 результатам, полученным для каждого из двух аттестованных материалов в 20 выполненных сериях, с использованием формулы 1 рассчитывают соответственно две величины относительного смещения (B_{20}).
8. Для каждого неаттестованного материала по 20 результатам, полученным для каждого из двух неаттестованных материалов в 20 выполненных сериях, с использованием формул 2-4 рассчитывают соответственно два значения коэффициента общей аналитической вариации (CV_{20}).

Примечание. При использовании на стадии 3 для текущего контроля качества **аттестованных** контрольных материалов и в том числе и для текущего межсерийного контроля (вместо неаттестованных материалов) значения CV_{10} (пункт 4) и CV_{20} (пункт 8) рассчитывают по результатам их исследований.

9. Проверяют, что полученные значения B_{20} и CV_{20} не превышают их предельно допустимых значений, приведенных в таблице 1 Приложения 3 данного документа. Если это условие выполняется, делают окончательный вывод о возможности использования рассматриваемой методики для целей лабораторной диагностики и переходят к построению контрольных карт. В случае превышения одним из полученных значений одной или обеими величинами B_{20} и/или CV_{20} соответствующих предельно допустимых значений проводят дополнительную работу по устранению источников повышенных смещения и/или вариации или избирают другую методику определения данного показателя (с более высокими аналитическими характеристиками).

Примечания.

1. Если лаборатория располагает ограниченным количеством аттестованных контрольных материалов, не позволяющим выполнить по 20 измерений, допускается сделать окончательную оценку смещения методики по величинам B_{10} , определенным по 10 измерениям каждого из материалов.
2. Если лаборатория располагает только одним аттестованным контрольным материалом, допускается также выполнить окончательную оценку смещения методики по величине B_{20} , полученной для единственного аттестованного материала. В исключительных случаях допускается сделать окончательную оценку смещения методики с использованием единственного аттестованного материала по величине B_{10} .

Для решения второй задачи (построения контрольной карты) выполняют следующее:

Из полученных 20 результатов исследований определяемого показателя для каждого из двух контрольных из двух контрольного материала, предназначенных предназначенного для текущего межсерийного контроля, рассчитывают:

- среднюю арифметическую величину $\bar{X}$,
- среднее квадратическое отклонение S ,
- контрольные пределы: $\bar{X} \pm 1S$, $\bar{X} \pm 2S$ и $\bar{X} \pm 3S$.

Если в ряду результатов, полученных для одного из контрольных материалов, есть значение, выходящее за пределы $\pm 3S$, то его отбрасывают и для этого материала проводят еще одну аналитическую серию, после чего снова подсчитывают значения $\bar{X}$ и S .

Для каждого из материалов с использованием рассчитанных значений строят контрольную карту. Последняя представляет собой график, на оси абсцисс которого откладывают номер аналитической серии (или дату ее выполнения), а на оси ординат - значения определяемого показателя в контрольном материале (рис. 1). Через середину оси ординат проводят линию, соответствующую средней арифметической величине $\bar{X}$, и параллельно этой линии отмечают линии, соответствующие контрольным пределам:

$\bar{X} \pm 1S$ - контрольный предел “1 среднее квадратическое отклонение”;

$\bar{X} \pm 2S$ - контрольный предел “2 средних квадратических отклонения”;

$\bar{X} \pm 3S$ - контрольный предел “3 средних квадратических отклонения”.

Проведение контроля качества биохимических исследований на примере определения общего белка сыворотки крови биуретовым методом

Стадия 1 (вводная): оценка внутрисерийной воспроизводимости методики

1. Проводим исследование общего белка в контрольном материале 1- 10 измерений и контрольном материале 2- 10 измерений
2. Рассчитываем для каждой серии среднее значение($\bar{X}$), среднеквадратичное отклонение(S) и коэффициент вариации (CV_{BC}).
3. Сравниваем с данными таблицы 1, где $CV_{10} = 4$, а $CV_{BC} \leq 0,5 CV_{10}$

Стадия 2: 1. оценка смещения и коэффициента общей аналитической вариации методики.

1. проводим 10 измерений одновременно.
2. проводим исследование еще 10 измерений в контрольном материале по 2-3 серии в день
3. рассчитываем по 10 первым B_{10} , CV_{10}
4. Сравниваем результаты с данными таблицы 5. Рассчитываем B_{20} и CV_{20} , где (1,8%).

2. построение контрольной карты.

Рассчитываем $\bar{X}$, S , контрольные пределы.

Строим график.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Внутрिलाбораторный контроль качества лабораторных исследований
2. Общие принципы организации и проведения внутрिलाбораторного контроля качества в КДЛ
3. Правила проведения внутрिलाбораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов
4. Контрольные материалы
5. Требования к контрольным материалам
6. Статистические основы оценки погрешностей количественных методов исследования с применением контрольных материалов.
7. Погрешности измерения
8. Порядок проведения внутрिलाбораторного контроля качества

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3. Основные приемы количественного анализа. Автоматические методы исследования. Автоанализаторы.

Принцип работы гематологических анализаторов.

Цель работы: Ознакомить студентов с методикой работы на автоматическом гематологическом анализаторе Medonic, интерпретировать полученный результат.

На сегодняшний день существует ряд фирм, производящих гематологические анализаторы. Наиболее известные аппараты GENYS, Hemascreen, Medonic, Mimer, Micros.

Все они имеют ряд своих преимуществ и недостатков, но в их основе положен следующий принцип работы:

Принцип проточной цитометрии.

Клеточная суспензия попадает в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку. Условия подобраны таким образом, что клетки выстраиваются друг за другом за счет так называемого гидродинамического фокусирования струи в струе. В момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксируют рассеяние света под малыми углами (от 1° до 10°) и рассеяние света под углом 90° клеток.

Далее, состав и характеристики крови определяют по трём параметрам: электрическому сопротивлению, ёмкости и светорассеянию. Эти характеристики определяются следующими методами:

А) $V=Volume$

Метод, лежащий в основе подсчета клеток и определения их объема (принцип Культера), основан на изменении сопротивления в электрической цепи при прохождении подсчитываемых частиц через микроотверстие. Амплитуды образующихся при этом импульсов пропорциональны размерам клеток, а их количество -- числу клеток.

Б) $C=Conductivity$

Ёмкостные характеристики клеток, дают информацию об их внутренней структуре, в том числе плотность и размеры ядра, а также позволяют определить электрическую непрозрачность клетки и оценить сигнал проводимости. Используются для определения размера ядра, его плотности, соотношения ядро/цитоплазма, а также для выявления клеток одного размера, но разной внутренней структуры.

В) $S=Scatter$

Характеристики светорассеяния позволяет оценить рассеяние лазерного излучения неокрашенными клетками, получить информацию о гранулярности и структуре поверхности клеток, сегментированности ядер, а также позволяет классифицировать субпопуляции лейкоцитов и ретикулоцитов.

Г) Принцип "VCS"

Уникальное сочетание трёх способов измерения позволяет быстро, с высокой чувствительностью и достоверностью проводить гематологические исследования, включая дифференцировку популяций лейкоцитов и оценку ретикулоцитов.

В современных приборах часто используются дополнительные приёмы для повышения точности исследований; такие как IntelliKinetics -- процесс подготовки образца, осуществляемый в приборе, автоматически корректируется в зависимости от условий окружающей среды (изменение времени инкубации, объема лизирующих реагентов т.д.). AccuGate -- программное обеспечение, позволяющее с высокой точностью и достоверностью оценивать изменения параметров клеток (объема, электрической проводимости и непрозрачности, светорассеяния).

В результате исследования крови на гематологических анализаторах получают следующие параметры: WBC, RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW, Plt, MPV, PDW, Pct, LY%, LY#, MO%, MO#, NE%, NE#, EO%, EO#, BA%, BA#, RET%, RET#, MRV, MSCV, IRF, HLR%, HLR# (количество параметров разное для разных аппаратов).

Определяемые параметры:

WBC - Лейкоциты

RBC - Эритроциты

Hgb - Гемоглобин, г/л

Hct - Гематокрит, %

MCV - Средний объем эритроцитов

MCH - Среднее содержание гемоглобина в эритроците

MCHC - Средняя концентрация гемоглобина в эритроците

RDW - Показатель гетерогенности эритроцитов

Plt - Тромбоциты

MPV - Средний объем тромбоцитов

PDW - Показатель гетерогенности тромбоцитов

Pct - Тромбокрит

LY% - Лимфоциты, %

LY# - Лимфоциты, мкл

MO% - Моноциты, %

MO# - Моноциты, мкл

NE% - Нейтрофилы, %

NE# - Нейтрофилы, мкл

EO% - Иозонофилы, %

EO# - Иозонофилы, мкл

BA% - Базофилы, %

BA# - Базофилы, мкл

RE% - Ретикулоциты, %

RE# - Ретикулоциты, мкл

MRV* - Средний объем ретикулоцитов

IRF* - Коэффициент зрелости ретикулоцитов

HLR%* - Зрелые ретикулоциты, %

HLR#* - Зрелые ретикулоциты, мкл

MSCV* - Сферичность

На основе полученных параметров можно получить важные характеристики исследуемой крови:

- Гистограммы распределения эритроцитов и тромбоцитов.
- Подсчет пяти субпопуляций лейкоцитов.
- Выявление наличия в образце незрелых и патологических клеток.
- Определение ретикулоцитов.
- Соотношение клеток, экспрессирующих CD4 и CD8.

Последовательность действий при запуске

Описанная ниже последовательность действий — необходимая ежедневная процедура при запуске анализатора. Существует всего два простых шага, которые пользователю необходимо выполнить для прохождения фоновой и контрольной последовательностей с детальными инструкциями по каждому шагу. Данная последовательность при запуске является опциональной и может быть пропущена, если есть необходимость в других процедурах первоначального запуска.

Для выполнения данной процедуры должна быть включена последовательность при запуске, в противном случае следуйте процедуре фоновой проверки и КК вручную

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Принцип действия анализатора
2. Калибровка анализатора
3. *Принцип проточной цитометрии*
4. *Параметры, референсные значения*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. Оценка аналитической надежности методов исследования. Основы внутрилабораторного контроля качества.

Цель работы: Определить критерии аналитической надежности лабораторных исследований

Предельно допустимая общая аналитическая погрешность не должна превышать 50 % показателя внутрииндивидуальной вариации: $CVA < 0,5 * CV1$

Предельно допустимое относительное аналитическое смещение не должно превышать 25% суммарной биологической вариации: $B (\%) < 0,25 * [(CV1)^2 + (CVG)^2]^{1/2}$

При повышенном уровне точности применяют коэффициент 0,25 (вместо 0,5) для расчета общей аналитической вариации и коэффициента 0,125 (вместо 0,25) для относительного аналитического смещения, при пониженном уровне точности используют соответственно коэффициенты 0,75 и 0,375.

Для диагностических целей показатель предельно допустимой общей аналитической погрешности должен соответствовать неравенству $CVA < 0,58 * [(CV1)^2 + (CVG)^2]^{1/2}$

При мониторинге течения заболеваний предельное значение систематической погрешности должно соответствовать неравенству $dSE < 0,5 * CV1$

Допустимая разница результатов между двумя методами, используемыми для исследования одной и той же величины в одной лаборатории не должно превышать 1/3 размера внутрииндивидуальной вариации для данного аналита

Общая аналитическая погрешность при исследовании лекарственных препаратов с целью терапевтического мониторинга должна соответствовать неравенству $CVA < 0,25 * [(2T/1-1)/(2T/1+1)] * 100$, где Т – интервал между введение доз препарата, Т – период полураспада препарата

2.Правила оценки эффективности лабораторных методов. Точность, чувствительность, специфичность, воспроизводимость, правильность исследований. Основные критерии, по которым оценивают метод исследования, — точность, воспроизводимость, специфичность, чувствительность

Точность характеризует достоверность метода в определении точного значения величины (концентрации) вещества. Например, систематическая разница между результатами определения натрия в одной пробе более 3 ммоль/л считают неприемлемой.

Воспроизводимость метода оценивают путём измерения концентрации вещества в одной и той же пробе несколько раз в один день и в одной серии проб. На следующий день делают такие же измерения с той же самой пробой. Обычно отклонения при измерениях подчиняются закону Гаусса, что говорит о стабильности метода. Для каждого ряда измерений рассчитывают среднюю величину ($\bar{X}$). Затем находят разницу между значением каждого измерения и этой средней и рассчитывают среднеквадратическое отклонение (S) и коэффициент вариации (V). Определяют коэффициент вариации в другие дни, и если он не превышает 5%, то метод исследования считают адекватным

Основные характеристики лабораторного теста — его диагностическая чувствительность и специфичность. Вероятность положительного результата диагностического теста в присутствии болезни называется чувствительностью метода, а вероятность отрицательного результата в отсутствие болезни — его специфичностью. Чувствительный тест редко «пропускает» пациентов, у которых есть заболевание. Специфический тест, как правило, «не относит» здоровых людей к категории больных.

3.Лабораторные ошибки. Внутренний контроль качества лабораторных исследований. Правила построения и оценки контрольных карт. Систематическая ошибка и случайная. Систематическая ошибка (смещение) — систематическое (неслучайное, одностороннее) отклонение результатов от истинных значений)

Разновидности:

Обусловленные отбором. Возникают, когда сравниваемые группы пациентов различаются не только по изучаемому признаку, но и по другим факторам, влияющим на исход.

Обусловленные измерением. Возникают, когда в сравниваемых группах больных используются разные методы измерения

Обусловленные вмешивающимися факторами. Возникают, когда один фактор связан с другим, и эффект одного искажает эффект другого.

Случайная вариация – отклонение результата исследования от истинного, обусловленное исключительно случайностью.

Последовательность процедур при ведении внутрилабораторного контроля качества.

Процедура	Исследуемый материал	Количество серий	Количество измерений в серии	Рассчитываемые показатели
Стадия 1				

Оценка повторяемости измерений	Контрольный материал или проба пациента	1	10	CVW
Стадия 2				
Предварительная оценка относительного смещения	Аттестованные контрольные материалы	10	1	B10
Предварительная оценка прецизионности измерений	Контрольные материалы для текущего ежесерийного контроля	10	1	CV10
Построение контрольной карты	Контрольные материалы для ежесерийного контроля			
Окончательная оценка относительного смещения	Аттестованные контрольные материалы	20	1	B20
Окончательная оценка прецизионности измерений	Контрольные материалы для текущего ежесерийного контроля	20	1	CV20

Контрольные правила

13S – Одно из контрольных измерений выходит за пределы 3S

22S – два последних контрольных измерения превышают предел 2S

R4S – два контрольных измерения в рассматриваемой аналитической серии расположены по разные стороны от коридора 2S

10X – десять последних контрольных измерений расположены по одну сторону от линии, соответствующей средней.

Порядок оценки контрольных карт

Проверяют присутствие на контрольных картах предупредительного контрольного правила 12S

При наличии таких результатов последовательно проверяют контрольные правила, при наличии одного из них серия признается неудовлетворительной

Все результаты следует считать неприемлемыми

Контрольные признаки 22S 41S 10X следует проверять на одной или обеих контрольных картах.

Метод контрольных карт. Ежедневно работник лаборатории при проведении всех видов анализа наряду с опытными пробами исследует контрольный материал. Определение содержания компонентов в контрольном материале проводят одновременно с исследованием опытных проб, при этом вместо сыворотки или плазмы крови берут контрольный материал в таком же количестве. Контрольные материалы могут быть приготовлены в лаборатории самостоятельно (сливные сыворотки) или закуплены у фирм — коммерческие контрольные материалы. В свою очередь, коммерческие сыворотки могут быть аттестованными (с известным содержанием компонентов) и неаттестованными (с неизвестным содержанием компонентов). Неаттестованные контрольные сыворотки в первую очередь используются для контроля воспроизводимости, а аттестованные — правильности.

Определение каждого компонента в контрольном материале проводят методом, применяемым в данной лаборатории. Результаты ежедневно регистрируются. Для аттестованных контрольных материалов по 20-ти результатам, полученным в 20 выполненных сериях, рассчитывают:

среднюю арифметическую $\bar{X}$;

среднее квадратическое отклонение S ;

коэффициент вариации CV ;

величину относительного смещения B .

Если используют неаттестованный материал или сливные сыворотки, по полученным результатам рассчитывают $\bar{X}$, S и CV . Проверяют, что полученные значения B и CV не превышают их предельно допустимых значений. Если это условие выполняется, делают вывод о возможности использования рассматриваемой методики для целей лабораторной диагностики и переходят к построению контрольных карт. В случае превышения одним из полученных значений B или CV соответствующих предельно допустимых значений проводят дополнительную работу по устранению источников повышенного смещения или вариации или избирают другую методику определения данного показателя.

Контрольная карта представляет собой график, на оси абсцисс которого откладывают номер аналитической серии (или дату ее выполнения), а на оси ординат — значения определяемого показателя в контрольном материале. Через середину оси ординат проводят линию, соответствующую средней арифметической величине $\bar{X}$, и параллельно этой линии отмечают линии, соответствующие контрольным пределам:

$\bar{X} \pm 1S$

$\bar{X} \pm 2S$

$\bar{X} \pm 3S$

Появление контрольных признаков $13S$ и $R4S$ свидетельствует об увеличении случайных ошибок, в то время как признаки $22S$, $41S$, $10X$ — об увеличении систематической ошибки методики. После устранения причин появления повышенных погрешностей все пробы, проанализированные в этой серии (и пациентов, и контрольные), исследуют повторно. Методы, использующие контрольные материалы, наиболее широко применяются для контроля качества в КДЛ. Однако эти методы не выявляют ошибку в целом.

4. Межлабораторный контроль качества. Обобщаемость как показатель достоверности лабораторных исследований. Вопросы стандартизации лабораторных исследований. Межлабораторный КК - это контроль сравнимости рез-тов, полученных в нескольких лабораториях на одном и том же контрольном материале одними и теми же методами или методами, дающими статистически достоверно совпадающие рез-ты.

Обобщаемость – внешняя характеристика, определяется тем, в какой мере результаты данного исследования применимы к другим группам больных.

Стандартизация – деятельность, направленная на достижение упорядоченности в определенной области путем установления положений для всеобщего и многократного применения в отношении реально существующих и потенциальных задач.

Стандарты:

Внутри страны (ГОСТы), международные (ISO)

5. Организация и основные требования к преаналитическому этапу лабораторных исследований Преаналитический (долабораторный) – этап, включающий комплекс мероприятий по подготовке пациента к обследованию, взятие и обработку биологического материала.

Части преаналитического этапа

Внелабораторная:

А) составление заявки на лабораторное исследование и оформление бланка-направления;

Б) подготовка пациента, основанная на знании биологических ритмов, особенностей

проведения исследований и клинической интерференции-влияние лекарственных препаратов на результаты лабораторных исследований;

В) процедура взятия биологического материала для исследования;

Г) хранение материала в процедурном кабинете и его доставка в лабораторию

Внутрилабораторная:

А) регистрация и маркировка доставленного в лабораторию биоматериала

Б) пробоподготовка биоматериала к исследованиям (центрифугирование, аликвотирование, маркировка, доставка биоматериала на рабочие места)

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА НА ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОМ ЭТАПЕ

v Неустраняемые факторы (возраст, пол, этническая группа, беременность);

v Варьирующие факторы (диета, голодание, физические нагрузки, повышенное атмосферное давление, курение, прием алкоголя, кофеина, наркотических средств, стресс);

v Время взятия крови (циркадные ритмы, менструальный цикл, время относительно приема пищи, лечебных и диагностических процедур);

v Техника взятия крови (положение тела больного, использование жгута, процедура флеботомии, последовательность разных пробирок, качество и количество пробы, транскатетерный способ взятия крови, ведение документации);

v Применение специальных добавок (антикоагулянты, ингибиторы гликолиза, консерванты, сепарирующие гели);

v Правила сбора мочи и ликвора;

v Транспортировка и хранение проб;

v Центрифугирование;

v Браковка материала (гемолиз, хилез, фибриновые сгустки, иктеричность).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5. Аналитические характеристики методов. Правила установления референтных интервалов и пределов. Обеспечение сопоставимости результатов лабораторных исследований

Цель работы: Ознакомить студентов с правилами установления референтных интервалов и пределов.

Сущность лабораторного исследования - анализ пробы биоматериала, взятой у пациента, с целью обнаружить или измерить содержание в ней компонентов, имеющих доказанную причинно-следственную связь с предполагаемым патологическим процессом. Информация о данных компонентах, представленная в описательной или количественной форме, составляет результат проведенного исследования. Потребителю (назначившему данное исследование врачу или заказавшему анализ пациенту) важно, чтобы представленная информация обладала следующими свойствами:

аналитической надежностью, т.е. точно отражала содержание искомого компонента в пробе;клинической информативностью, т.е. точно отражала процессы, происходящие в организме пациента, и отвечала на вопросы о наличии и характере предполагаемой патологии;оперативностью, т.е. была доступна в сроки, опережающие темп развития патологического процесса и позволяющие своевременно предпринять необходимые лечебные меры. Лабораторное исследование можно рассматривать как процесс, имеющий вход и выход. Продукт на выходе данного процесса - информация об исследованных аналитах. Характер входа зависит от точки отсчета. Ранее за вход в

процесс исследования принимали поступление образца биоматериала в лабораторию и начало собственно аналитических процедур. Однако со временем стало ясно, что для качества лабораторной информации крайне важны этапы, которые предшествуют поступлению исследуемого образца в лабораторию, начиная с момента назначения исследования врачом.

Согласно современной концепции, в процессе клинического лабораторного исследования выделяют три этапа:

внелабораторную фазу: выбор и назначение исследования врачом; подготовку пациента к проведению анализа, взятие образца биоматериала, чаще всего клиническим медперсоналом; ○ маркировку образца для идентификации его с пациентом;

необходимую в ряде случаев первичную обработку, краткосрочное хранение и транспортировку образца биоматериала в лабораторию;

внутрилабораторную фазу: регистрацию образца биоматериала; идентификацию образца с пациентом; распределение биопроб или их порций по назначенным видам исследований;

необходимую дальнейшую обработку проб для подготовки к анализу.

На результаты лабораторных исследований могут влиять следующие факторы преаналитического этапа: ошибки идентификации пациента и образца биоматериала;

биологические факторы - пол, возраст, этнос, физиологическое состояние (физическая тренированность, беременность), биологические ритмы, влияния среды обитания;

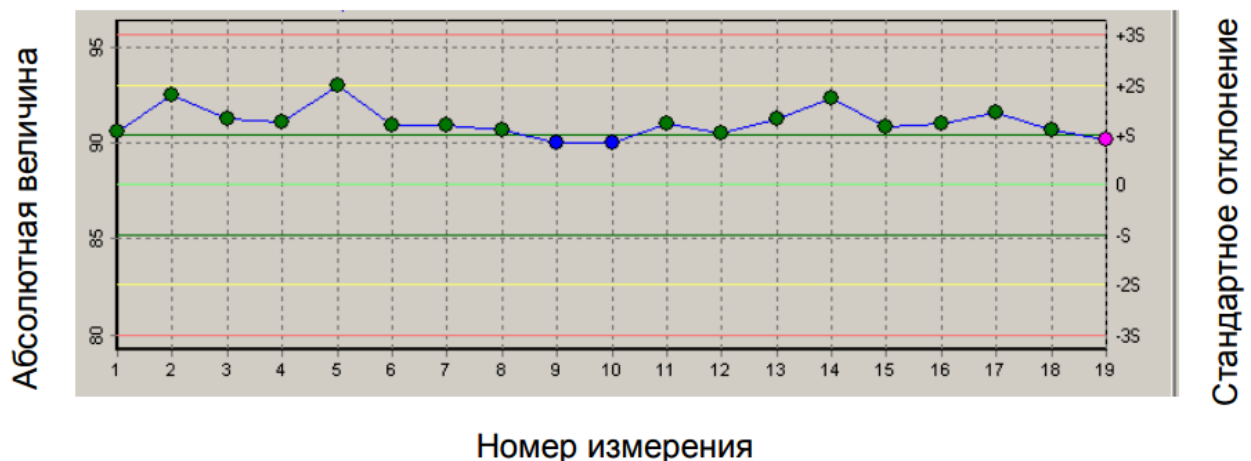
устраняемые факторы - прием пищи, голодание, положение тела, физическая активность, курение, употребление алкоголя; ятрогенные факторы: диагностические процедуры (пальпация, пункции, биопсии, функциональные тесты, физический стресс при нагрузках, эндоскопия, введение контрастных сред, иммуносцинтиграфия); оперативные вмешательства; лечебные процедуры (инъекции и трансфузии, диализ, лучевая терапия);

прием лекарственных препаратов (в том числе без назначения врача); условия взятия, временного хранения и транспортировки биоматериала: время взятия, срок сбора; подготовка участка тела для взятия материала; процедуры взятия крови, мочи, других биоматериалов; посуда (чистота, материал); воздействие факторов среды (температуры, состава атмосферы); консерванты, антикоагулянты; процедуры первичной обработки (смешивание, центрифугирование, охлаждение, замораживание);

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6. Построение контрольных карт.

Цель работы: Ознакомить студентов с правилами построения контрольных карт.

Контрольные карты строятся для каждого лабораторного показателя и каждого контрольного материала • Из 20 результатов, полученных в установочной серии, рассчитывают среднее значение ($\bar{X}$) и S и устанавливают контрольные пределы: $\bar{X} \pm 1S$, $\bar{X} \pm 2S$ и $\bar{X} \pm 3S$ • Если в ряду результатов есть значение, выходящее за пределы $3S$, то это значение отбрасывается и проводится еще одна аналитическая серия. Построение контрольной карты.



Контрольные правила Вестгарда Задачи: • минимизировать ложную выбраковку данных
 • обнаружить максимум ошибок Правила: • 12s • 13s • 22s • R4s • 41s • 10x

• Если присутствует хотя бы один из вышеперечисленных контрольных признаков, аналитическая серия бракуется. – найти источник ошибки, – устранить причину, – переделывать всю серию – и контрольные материалы и пробы пациентов • Если ни один из признаков Вестгарда не определяется, серия принимается, и результаты пациентов сообщаются лечащим врачам.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ к лабораторным работам №4-6

1. К преаналитическому этапу относится.
2. К аналитическому этапу относится.
3. Правила Вестгарда
4. К постаналитическому (послеаналитический) этапу относится.
5. Сущность лабораторного исследования
6. Межлабораторный контроль качества
7. Факторы, влияющие на результат
8. Лабораторные ошибки
9. Внутренний контроль качества
10. Межлабораторный контроль качества

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7. Лабораторные информационные системы. Методы видеодигитальной регистрации. Проточная цитометрия

Цель работы: Ознакомить студентов с лабораторными информационными системами

Современная клинико-диагностическая лаборатория (КДЛ) - сложная производственная система, в которой реализуются сотни технологических процессов. Использование лабораторных информационных систем (ЛИС) в целях создания современной технологии управления КДЛ, гарантирующей высокое качество результатов лабораторных исследований при минимальных затратах, - единственный конструктивный путь и один из ключевых инструментов, позволяющих достичь поставленной цели. ЛИС предназначены для комплексной автоматизации деятельности КДЛ, поэтому их называют системами управления лабораторной информацией. Управление современной КДЛ предусматривает деятельность по организации непосредственно технологического процесса производства лабораторных анализов и целого комплекса других процессов, таких как материальное обеспечение,

экономическая и клиническая эффективность. ЛИС позволяют не только решать многочисленные задачи ввода и хранения лабораторных данных, но и на базе новейших информационных технологий интегрироваться с другими системами автоматизации для участия в решении задач всего лечебно-профилактического учреждения.

ЛИС состоит из технических средств (центрального процессора, устройств ввода-вывода, запоминающих устройств, интерфейсов, автоанализаторов) и программного обеспечения (компьютерных программных средств, обеспечивающих работу технических средств и обработку информации).

В функции ЛИС входят:

регистрация доставленного в лабораторию биоматериала и заявок на его исследования, их распределение по частным технологическим процессам выполнения анализов, регистрация и оформление результатов исследований, оперативный и ретроспективный анализ деятельности лаборатории;

автоматизация выполнения исследований, включая ввод и обработку данных с автоанализаторов, составление отчетов о загрузке оборудования;

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Лабораторная информационная система
2. Назначение ЛИС
3. Складской учет лаборатории
4. *Требования к автоматизации первичного сбора, учета, хранения и обработки данных*
5. *Обеспечение информационной поддержки медицинского персонала и администрации*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8. Иммунохимические методы анализа. Мультиплексный иммунный анализ. Молекулярная клиническая диагностика

Цель работы: ознакомить студентов с методом полимеразной цепной реакции.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - экспериментальный метод молекулярной биологии, который представляет собой специфическую амплификацию нуклеиновых кислот, индуцируемую синтетическими олигонуклеотидными праймерами *in vitro*.

Идея разработки метода ПЦР принадлежит американскому исследователю Kary Mullis, который в 1983 г. создал метод, позволивший амплифицировать ДНК в ходе циклических удвоений с помощью фермента ДНК-полимеразы в искусственных условиях. Через несколько лет после опубликования этой идеи, в 1993 г., K. Mullis получил за нее Нобелевскую премию.

В начале использования метода после каждого цикла нагревания-охлаждения приходилось добавлять в реакционную смесь ДНК-полимеразу, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре. Процедура была очень неэффективной, требовала много времени и фермента. В 1986 г. ее существенно модифицировали за счет использования ДНК-полимеразы из термофильных бактерий. Эти ферменты способны выдерживать множество циклов реакции, что позволяет автоматизировать проведение ПЦР. Одна из наиболее часто использовавшихся термостабильных ДНК-полимераз была выделена из бактерий *Thermus aquaticus* и названа *Taq*-ДНК-полимеразой.

Суть метода. Метод основан на многократном избирательном копировании определенного участка ДНК при помощи фермента Taq- ДНК-полимеразы. Полимеразная цепная реакция позволяет получить амплификаты длиной до нескольких тысяч пар нуклеотидов. Для увеличения длины ПЦР-продукта до 20-40 тыс. пар нуклеотидов применяют смесь различных полимераз, но все равно это значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки.

Реакция проводится в программируемом термостате (амплификаторе) - приборе, который может проводить достаточно быстро

охлаждение и нагревание пробирок (обычно с точностью не менее 0,1 °С). Амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта» и последующего хранения. Для ПЦР в режиме реального времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшет, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Денатурация ДНК-матрицы проводится с помощью нагревания реакционной смеси до 94-96 °С на 5-90 с, чтобы цепи ДНК разошлись. Следует отметить, что перед первым циклом осуществляют предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2-5 мин для полной денатурации исходной матрицы, что позволяет снизить количество неспецифичных продуктов реакции.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Понятие прямой ДНК-диагностики.
2. Материал для проведения ДНК-диагностики.
3. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).
4. Общая схема проведения ПЦР.
5. Использование электрофореза как метода детекции продуктов ПЦР-анализа.
6. *Конструирование праймеров.*
7. *Термостабильные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы.*
8. *Основные компоненты реакционной смеси при проведении ПЦР*
9. *Характеристики ПЦР*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9. Ферменты. Субстраты и продукты биохимических реакций. Индивидуальные белки.

Цель работы: Определение общего белка сыворотки и плазмы крови с набором реактивов Общий белок

Принцип метода. Белки образуют с ионами меди в щелочной среде комплекс синего цвета, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации общего белка в пробе и измеряется фотометрически. При отщеплении атома водорода от энольной группы пептидной связи появляется отрицательный заряд, обеспечивающий связывание атома кислорода с ионом меди. Различие в интенсивности окрашивания комплексов, образованных альбумином и глобулинами, незначительное.

Состав набора

Реагент 1. Калий-натрий виннокислый - 16 ммоль/л. Гидроокись натрия - 100 ммоль/л. Сульфат меди - 6,0 ммоль/л. Йодид калия - 15 ммоль/л

Реагент 2. Калибратор - 70 г/л

Аналитические характеристики. Набор обеспечивает линейную область определения концентрации общего белка в диапазоне от 10 до 150 г/л. *При содержании общего белка в сыворотке или плазме крови выше 150 г/л анализируемую пробу следует развести*

физиологическим раствором и полученный результат умножить на разведение.

Проведение анализа. Длина волны - 540 (520-560) нм. Длина оптического пути - 1 см. Температура - 18-25°C (37°C). Измерение против холостой пробы по реагенту 1.

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Образец	20	—	—
Вода дистилл.	—	—	20
Калибратор	—	20	—
Реагент 1	1000	1000	1000

* - при работе на КФК объем пробы и реагента увеличить в 5 раз.

Пробы перемешать и инкубировать при температуре +37°C или при комнатной температуре (+18–25°C) в течение 10 мин. Измерить оптическую плотность опытной (E_o) и калибровочной (E_k) проб против холостой пробы. Окраска растворов стабильна в течение 60 минут.

Расчет. Содержание общего белка (С) определить по формуле:

$$C \text{ (г/л)} = \frac{E_o}{E_k} \times 70$$

Референсные значения

Кровь из пуповины	48-80 г/л
Недоношенные	36-60
Новорожденные	46-70
1 неделя	44-76
7 месяцев – 1 год	51-73
1 – 2 года	56-75
> 3 лет	60-80
Взрослые, амбулаторно	64-83
Лежачие	60-78
> 60 лет	ниже на 2 г/л

Интерференция

↑ X – Декстран.

↑ K – Анаболические стероиды, андрогены, клофибрат, кортикостероиды, адреналин, инсулин, прогестерон, препараты щитовидной железы.

↓ X - Аминофеназон, сульфалазин, флюоресцин.

↓ K – Аллопуринол, эстрогены.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Общий белок плазмы крови
2. Особенности преаналитического этапа при исследовании белкового обмена
3. Методы исследования общего белка
4. Клинико-диагностическое значение определения общего белка в плазме крови.

Тема 2. Частные исследования в клинической лабораторной диагностике

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10. Гипоталамус-гипофиз. Диагностика заболеваний щитовидной железы

Цель работы: Определение активности γ-глутамилтрансферазы унифицированным колориметрическим методом. (γ-ГТФ-ВИТАЛ-01)

Принцип метода. $L\text{-}\gamma\text{-глютамил-3-карбокси-}p\text{-нитроанилид} + \text{глицилглицин} \rightarrow p\text{-нитроанилин} + L\text{-глютамилглицин}$ Количество образовавшегося в единицу времени p -нитроанилина, пропорциональное активности фермента, определяется по оптической плотности образца.

Состав набора

Реагент № 1. Буфер, pH 8,25 (конечная концентрация в рабочем реагенте Трис/HCl - 180 ммоль/л). Глицилглицин - 64 ммоль/л

Реагент № 2. Раствор уксусной кислоты - 5 г/л.

Реагент № 3. $L\text{-}\gamma\text{-глютамил-3-карбокси-}p\text{-нитроанилид}$ - 3,5 ммоль/л

Реагент № 4 – Калибратор. p -нитроанилин - 518 мг/л

Аналитические характеристики. **Линейность** - отклонение не более 5 % до активности 4000 нмоль/(с * л). **Время проведения анализа** - 15 мин.

Приготовление рабочего реагента. Смешать необходимые количества реагента № 1 и реагента № 3 в соотношении 4+1. Рабочий реагент стабилен 30 суток при температуре хранения 2-4°C.

Проведение анализа. Длина волны: 405 нм (ФЭК - 400 нм). Длина оптического пути: 1 см. Температура инкубации: 37°C.

Отмерить, мл	Опытная проба	Холостая проба
Рабочий реагент	0,5	0,5
Образец	0,05	-
Инкубировать точно 15 мин при 37°C. Добавить в пробирки:		
Реагент № 2	1	1
Бидистиллированная вода	2,5	2,5
Образец	-	0,05

Пробы перемешать и фотометрировать против холостой пробы. Стабильность окраски - не менее 8 часов. Расчет активности γ -глютамилтрансферазы в сыворотке и плазме крови производят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика

	Калибратор, мл	Бидистиллированная вода, мл	Активность ГГТ, нмоль/(с*л)
Проба 1	0,25	2,25	417
Проба 2	0,1	0,4	833
Проба 3	0,2	0,3	1667
Проба 4	0,2	0,05	3334
Проба 5	0,2	-	4166

Внести в соответствующие пробирки по 0,05 мл проб №№ 1-5, добавить по 1 мл реагента № 2 и по 2,5 мл бидистиллированной воды и перемешать. Фотометрировать против раствора реагента № 2, разведенного бидистиллированной водой в соотношении 1:3,5.

Построить калибровочный график зависимости адсорбции от активности фермента.

Нормальные величины

Мужчины: 250-1767 нмоль/(с*л)

Женщины: 167-1100 нмоль/(с*л)

1 U/л = 16,67 нмоль/(с*л).

Примечание. При низкой температуре в растворе калибратора могут выпадать кристаллы; в этом случае необходимо нагреть раствор до полного растворения осадка (не более 1 раза).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №11. Гормональная регуляция репродуктивной функции

Цель занятия: Тест-системы для иммуноферментного анализа Тест-системы для иммуноферментного анализа производства «Алкор Био» Диагностика репродуктивной функции

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)

Набор реагентов Гонадотропин ИФА-ФСГ предназначен для количественного определения концентрации фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Набор Гонадотропин ИФА-ФСГ рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

Состав набора

Комплект из двенадцати восьмилучных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ФСГ, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к ФСГ» - 1 пакет; калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Второму международному референсному препарату ФСГ человека WHO 78/549, содержащие известные количества ФСГ - 0; 2; 5; 25; 50 и 100 мМЕ/мл; концентрации ФСГ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов – 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл); конъюгат анти-ФСГ-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» - 1флакон (14 мл); концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» - 1флакон (14 мл); раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» - 1флакон (14 мл); стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» - 1флакон (14 мл); контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ФСГ, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1флакон (лиофилизированный препаратили жидкость 0,5 мл); пакет полиэтиленовый закрывающийся (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

Аналитические характеристики набора

Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к β-субъединице ФСГ с хорионическим гонадотропином, лютеинизирующим и тиреотропным гормонами.

Коэффициент вариации результатов определения ФСГ в одном и том же образце с использованием набора Гонадотропин ИФА-ФСГ не превышает 8%. Линейность. Зависимость концентрации ФСГ в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ФСГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 2-100 мМЕ/мл и составляет 90-110%. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ФСГ - соответствие измеренной концентрации ФСГ предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 5 мМЕ/мл. Процент открытия составляет 90-110%. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ФСГ в сыворотке крови человека не превышает 0,25 мМЕ/мл. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе

анализа, при высоких концентрациях анализата зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора Гонадотропин ИФА-ФСГ хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации ФСГ 50 000 мМЕ/мл. Клиническая проверка. Содержание ФСГ измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 40 здоровых мужчин в возрасте 21-39 лет, 120 здоровых женщин в возрасте 19-35 лет в различных фазах менструального цикла и 15 женщин в возрасте 49-65 лет в постменопаузе. Средняя концентрация ФСГ у мужчин составила 3,9 мМЕ/мл (1,0-11,8 мМЕ/мл). У женщин в фолликулиновой фазе цикла - 4,6 мМЕ/мл (1,8-11,3 мМЕ/мл), в овуляторном пике - 7,9 мМЕ/мл (4,9-20,4 мМЕ/мл), в лютеиновой фазе цикла - 3,3 мМЕ/мл (1,1-9,5 мМЕ/мл), в постменопаузе - 68,4 мМЕ/мл (31,0-130 мМЕ/мл). Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ФСГ, соответствующие нормальным.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ **к лабораторным работам № 10-11**

1. Общие свойства гормонов
2. Гормоны гипофиза, нормы, методы и клинико-диагностическое значение исследования
3. Гормоны щитовидной и паращитовидной желез, нормы, методы и клинико-диагностическое значение исследования
4. *Гормоны поджелудочной железы, нормы, методы и клинико-диагностическое значение исследования*
5. *Гормоны надпочечников, нормы, методы и клинико-диагностическое значение исследования*
6. *Половые гормоны, нормы, методы и клинико-диагностическое значение исследования*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12. Исследование кала и мочи.

Цель работы: лабораторная диагностика кала и мочи.

Принцип метода

Технология «Анализ мочи общий» выполняется с целью диагностики болезней, при профилактических обследованиях, для мониторинга течения болезни и эффективности лечения.

Исследование мочи имеет большое диагностическое значение не только при заболеваниях почек, но и многих других органов и систем организма.

Комплекс методов общего анализа мочи включает:

- макроскопическую оценку с описанием общих физических свойств;
- физические измерения (объем, относительная плотность);
- химические исследования, которые проводятся с помощью диагностических тест-полосок (качественный и полуколичественный анализ): определение pH, относительной плотности, белка, глюкозы, кетоновых тел, билирубина, уробилиногена, крови, лейкоцитов, нитритов, аскорбиновой кислоты; или химическими методами для подтверждения результатов определения белка, глюкозы и др. показателей, полученных тест-полосками.

- микроскопическое исследование осадка мочи.

Оборудование

Микроскоп, анализатор URISCAN, тест полоски, предметное стекло, покровное стекло, центрифуга, центрифужные пробирки

нормальные величины

Цвет мочи	соломенно-желтая
-----------	------------------

Прозрачность мочи	прозрачная
Запах мочи	нерезкий
Реакция мочи или pH	pH больше 4 и меньше 7
Плотность мочи	В пределах 1012 г/л – 1022 г/л
Белок в моче	отсутствует, до 0,033 г/л
Глюкоза в моче	отсутствует, до 0,8 ммоль/л
Кетоновые тела в моче	отсутствуют
Билирубин в моче	отсутствует
Уробилиноген в моче	В пределах 5-10 мг/л
Гемоглобин в моче	отсутствует
Эритроциты в моче	до 3-х в поле зрения для женщин
	единичные в поле зрения для мужчин
Лейкоциты в моче	до 6-и в поле зрения для женщин
	до 3-х в поле зрения для мужчин
Эпителиальные клетки в моче	до 10-и в поле зрения
Цилиндры в моче	отсутствуют, единичные гиалиновые
Соли в моче	отсутствуют
Бактерии в моче	отсутствуют
Грибы в моче	отсутствуют
Паразиты в моче	отсутствуют

Исследуемый материал

Моча.

Подготовка к анализу.

Специальная подготовка не требуется

Ход работы

В стерильную пробирку налить 10 мл мочи оценить цвет, прозрачность, запах. Поместить в пробирку с мочёй тест полоску на 2 сек, после выждать 2 мин и поместить тест полоску в анализатор URISCAN и оторвать чек с результатом. Пробирку с мочёй поместить в центрифугу на 1500 об на 10 мин. после того как моча будет

отцентрифугированна слить надосадочную жидкость и провести микроскопическое исследование путем нативного препарата. Отмечать наличие форменных элементов осадка мочи в 2-3 полях зрения. Результат записать в лист выдачи анализа.

Исследование кала

Копрограмма— это лабораторное исследование каловых масс (**анализ кала**), во время которого оцениваются их физические, химические, биологические и микроскопические характеристики. Подробное изучение состава и структуры кала позволяет выявить некоторые заболевания желудочно-кишечного тракта, при которых у человека нарушается пищеварение или всасывание питательных веществ.

Методика исследования функций внутренних органов по характеру каловых масс обоснована научно. Дело в том, что принимаемая человеком пища в процессе прохождения через желудочно-кишечный тракт подвергается интенсивной обработке. Она измельчается механически, после чего перемешивается со слюной, желудочным соком и другими пищеварительными ферментами, которые вырабатываются печенью и поджелудочной железой. Все это способствует расщеплению пищевых продуктов на простейшие вещества, которые всасываются через слизистую оболочку кишечника в организм человека. Невсосавшиеся остатки пищи, вода и микроорганизмы (являющиеся постоянными обитателями толстого кишечника, также принимающими участие в процессах пищеварения) формируют каловые массы.

Оборудование

1. Предметные стекла.
2. Покровные стекла.
3. Стекланные палочки длиной 15-20 см с оплавленными концами.
4. Чашки Петри.
5. Йодистый калий.
6. Йод.
7. Нейтральрот.
8. Бриллиантгрюн.
9. Судан III.
10. Этиловый спирт 96°.
11. Дистиллированная вода.
12. Дезинфицирующие растворы.

Исследуемый материал каловые массы

Подготовка к анализу специальной подготовки не требуется

Ход работы

Препараты для микроскопии готовят из растертого с водой кала и из видимых примесей (если они имеются). Стекланную палочку с оплавленным концом вносят в растертый кал. Взятую каплю материала помещают на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и слегка придавливают его сверху.

Из видимых примесей готовят второй препарат с помощью шпателя и иглы. Слизь, кровь, остатки пищи и другие образования помещают на предметное стекло рядом с первым препаратом, приготовленным из растертого кала, и накрывают покровным стеклом (слизистые клочки предварительно промывают водопроводной водой).

Для лучшего распознавания и выявления микроскопических элементов кала окрашивают три препарата: первый — реактивом Люголя, второй — смесью нейтральрот + бриллиантгрюн, третий — Суданом III.

Реактивы для окраски препаратов готовят следующим образом:

1. Реактив Люголя: к 2 г йодистого калия, помещенного в колбочку емкостью 50 мл, приливают около 1 мл дистиллированной воды, прибавляют 1 г кристаллического йода и дистиллированной воды до метки 50 мл.
2. Раствор краски судан III: растворяют 2 г краски судан III в 10 мл 96° спирта и приливают 90 мл 80° спирта или ледяной уксусной кислоты до получения ярко-красного окрашивания.
3. 1% водный раствор нейтральрота: в колбочку на 100 мл помещают 1 г краски нейтральрот и доливают дистиллированной водой до метки 100 мл.
4. 2% водный раствор бриллиантгрюна: 2 г краски бриллиантгрюн помещают в колбочку на 100 мл и доливают дистиллированной водой до метки 100 мл.

Техника окраски препаратов. К препарату прибавляют 1-2 капли соответствующего реактива, затем вновь накрывают его покровным стеклом и изучают под микроскопом.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Забор материала кал, моча.
2. Исследование физических свойств мочи.
3. *Исследование химических свойств мочи.*
4. Микроскопическое исследование осадка мочи.
5. *Бактериологическое исследование мочи.*
6. Микрофлору кала подразделяют на.
7. *Функции постоянной микрофлоры.*
8. При микроскопическом исследовании кала выявляют.
9. *При химическом исследовании кала оценивается.*
10. *При бактериологическом исследовании кала.*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13. Исследование спинномозговой жидкости.

Цель работы: лабораторная диагностика спинномозговой жидкости

Принцип метода. Спинномозговой анализ считается серьезной процедурой, и без весомых показаний (просто так, без подозрения на определенные болезни) она не проводится. Показания к проведению забора СМЖ можно разделить на два вида: показания в виде симптомов и показания в виде болезней, которые требуется подтвердить (или наоборот исключить).

Оборудование

Реактив самсона, Раствор Фуксина, уксусная кислота 5 %, карболовая кислота 1%, дистиллированная вода, камера фукса-разенталя, микроскоп.

нормы

Возраст	Кл/3 мкл	Кл в 1 мкл	Кл x10 ⁶ /литр
Менее 1 года	0-90	0-30	0-30
1-4 года	0-60	0-20	0-20
5 лет – пубертатный возраст	0-30	0-10	0-10
Взрослые	0-15	0-5	0-5

Иследуемый материал

СМЖ

Подготовка к анализу

Специальной подготовки не требуется.

Ход работы

Реактив Самсона: 2,5 мл спиртового раствора фуксина 1:10 + 30 мл уксусной кислоты + 2 г карболовой кислоты + дистиллированной воды до 100 мл, время окрашивания 10-15 минут. Окрашенный препарат помещают в камеру Фукса-Розенталя объемом 3,2 мкл. Лейкоциты считают на малом увеличении во всех 256 квадратах, при высоком плеоцитозе $200-1000 \times 10^6/\text{л}$ считают половину сетки и результат умножают на 2, при плеоцитозе свыше $1000 \times 10^6/\text{л}$ подсчитывают один ряд больших квадратов и результат умножают на 4.

Трактовка результатов

Атипичные клетки – чаще являются клетками опухолей ЦНС или её оболочек. Так же могут встречаться при хроническом воспалительном процессе (туберкулезный менингит, менингоэнцефалит, рассеянный склероз, энцефаломиелит) – это клетки эпендимы желудочковпаутинной оболочки, а так же лимфоциты, моноциты и плазмоциты с изменениями ядра и цитоплазмы.

Измененные клетки и тени клеток обнаруживаются при длительном нахождении в СМЖ. Чаще всего подвергаются аутолизу нейтрофильные гранулоциты, клетки паутинной оболочки, эпендимы желудочков. Диагностического значения измененные клетки и тени клеток не имеют.

Кристаллы в ликворе обнаруживаются редко. На 4–5 день после субарахноидального кровоизлияния, черепно-мозговой травмы обнаруживаются кристаллы гемосидерина, в случае распада опухоли в содержимом кисты можно обнаружить кристаллы гематоидина, холестерина, билирубина, так же кристаллы холестерина образуются в очагах жировой дистрофии, некроза ткани мозга и в кистах мозга.

Элементы эхинококка–крючья, сколексы и обрывки хитиновой оболочки пузыря эхинококка могут быть выявлены при множественном эхинококкозе мозговых оболочек. Находят их чрезвычайно редко.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Общая характеристика спинномозговой жидкости
2. Правила получения и доставки ликвора в лабораторию
3. Функции ликвора
4. *К физическим свойствам ликвора относится*
5. *К химическим свойствам ликвора относится*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 14. Исследование мокроты.

Цель работы: лабораторное исследование мокроты

Мокротой называется патологический секрет, выделяемый с кашлем из дыхательных путей. Важно помнить о правилах собирания материала для исследования: мокроту собирают после тщательного полоскания полости рта и горла в чистую сухую стеклянную банку или чашку Петри в утренние часы (до приема пищи).

Клиническое исследование мокроты включает осмотр, измерение количества, изучение физических, химических свойств, микроскопическое, бактериоскопическое, а при необходимости бактериологическое и цитологическое исследования.

Оборудование

Карболовый раствор генцианового фиолетового;

Раствор Люголя;

10 % раствор карболового фуксина.
нормальные величины

Показатель	Норма
Количество	10-100 мл в сутки
Цвет	бесцветная
Запах	отсутствует
Слоистость	отсутствует
Реакция рН	нейтральная или щелочная
Характер	слизистая

Иследуемый материал - макрота.

Подготовка к анализу не требует специальной подготовки

Ход работы

На фиксированный над пламенем горелки препарат кладут полоску фильтровальной бумаги и наливают раствор генцианового фиолетового. Красят 1 — 2 мин. Бумажку сбрасывают и заливают препарат раствором Люголя на 2 мин, а потом прополаскивают препарат в спирту до сероватого цвета. Промывают водой и окрашивают 10% раствором карболового фуксина 10—15 с. После этого препарат опять промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсионным объективом.

При микроскопическом изучении препаратов мокроты обнаруживают следующие элементы: стрептококки, стафилококки, диплококки, палочки Пфейфера, и другие микроорганизмы. Для выявления и подсчета количества эозинофилов в мокроте применяют окраску азур – эозином по Романовскому при которой зерна (гранулы) эозинофилов окрашиваются в красный цвет.

Трактовка результатов

микроскопическое исследование мокроты проводят в свежих неокрашенных и фиксированных окрашенных препаратах. При приготовлении препаратов необходим тщательный отбор материала. Лопаточкой или металлической петлей из мокроты выбирают все подозрительные комочки, кровяные прожилки и приготавливают из них препараты, помещая на предметное стекло. Приготовленный препарат исследуют под микроскопом вначале под малым, а затем под большим увеличением. Элементы мокроты, которые обнаруживаются в нативном препарате, можно разделить на три основные группы: клеточные, волокнистые и кристаллические образования.

Клеточные элементы. Плоский эпителий – это слущенный эпителий слизистой оболочки ротовой полости, носоглотки, надгортанника и голосовых связок, имеющий вид плоских тонких клеток. Одиночные клетки плоского эпителия встречаются всегда, в большом количестве – при воспалительных явлениях в ротовой полости и носоглотке.

Цилиндрический эпителий– эпителий слизистой оболочки бронхов и трахеи. Встречается в больших количествах при остром приступе бронхиальной астмы, остром и хроническом бронхите.

Макрофаги. Встречаются при различных воспалительных процессах в бронхах и легочной ткани (пневмонии, бронхиты). Макрофаги с явлениями жировой дистрофии – липофаги («жировые шары») – окрашиваемые суданомIII в оранжевый цвет, встречаются

при раке легкого, туберкулезе, эхинококкозе, актиномикозе. Макрофаги, содержащие гемосидерин –сидерофаги(старое название «клетки сердечных пороков»), имеют в цитоплазме золотисто-желтые включения, их определяют реакцией на берлинскую лазурь.Сидерофагивстречаются в мокроте у больных с застойными явлениями в малом круге кровообращения, при инфаркте легкого.

Пылевые макрофаги (кониофаги) распознаются по содержанию в цитоплазме частиц угля или пыли иного происхождения. Их обнаружение имеет значение в диагностике пневмокониозов и пылевого бронхита.

Опухолевые клеткичаще представлены в виде клеток плоскоклеточного (с ороговением или без него), железистого рака или аденокарциномы.

Лейкоциты.Встречаются почти в каждой мокроте; в слизистой – единичные, а в гнойной сплошь покрывают все поле зрения (иногда среди лейкоцитов можно выделить эозинофилы – крупные лейкоциты с отчетливой и темной зернистостью).

Единичные эритроциты могут встречаться в любой мокроте; в большом количестве обнаруживаются в мокроте, окрашенной кровью (легочное кровотечение, инфаркт легкого, застойные явления в легких и др.).

Волокнистые образования. Эластические волокна. Указывают на распад легочной ткани и обнаруживаются при туберкулезе, абсцессе, новообразованиях легких. Иногда при этих заболеваниях в мокроте встречаютсякоралловые волокна– грубые, ветвящиеся образования с бугристыми утолщениями вследствие отложения на волокнах жирных кислот и мыл, а такжеобызвествленные эластические волокна– грубые, пропитанные слоями извести палочковидные образования.

Фибринозные волокна – тонкие волоконца, которые заметно просветляются в препарате при добавлении 30% раствора уксусной кислоты, растворяются при добавлении хлороформа. Встречаются при фибринозном бронхите, туберкулезе, актиномикозе, крупозной пневмонии.

Спирали Куршмана – уплотненные закрученные в спираль образования из слизи. Спирали Куршмана наблюдаются при легочной патологии, сопровождающеися бронхоспазмом (бронхиальная астма, асматические бронхиты).

Кристаллические образования. Кристаллы Шарко – Лейдена встречаются в мокроте вместе с эозинофилами и имеют вид блестящих, гладких, бесцветных различной величины ромбов, иногда с тупо обрезанными концами. Образование кристаллов Шарко – Лейдена связывают с распадом эозинофилов и кристаллизацией белков. Они встречаются при бронхиальной астме, аллергических бронхитах.

Кристаллы гематоидина имеют форму ромбов и иголок (иногда пучков и звезд) золотисто-желтого цвета. Эти кристаллы являются продуктом распада гемоглобина, образуются в глубине гематом и обширных кровоизлияний, в некротизированной ткани.

Кристаллы холестерина– бесцветные, четырехугольной формы таблички с обломанным ступенеобразным углом; образуются при распаде жироперерожденных клеток, задержке мокроты в полостях и располагаются на фоне детрита (туберкулез, опухоли, эхонококкоз, абсцесс).

Кристаллы жирных кислот в виде длинных тонких игл и капелек жира содержатся при застое мокроты в полостях (абсцесс, бронхоэктазы).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Методика забора мокроты на общий анализ.
2. Методика забора мокроты на микобактерии тубер- кулеза.
3. Методика забора мокроты на бактериологическое исследование.
4. Оформление направления на исследования.
5. Правила транспортировки биологического материала в лабораторию

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 15. Исследование желчи.

Цель работы: лабораторная диагностика желчи

Желчь-продуцируется клетками печени и по желчным капиллярам продвигается к желчным ходам, которые сливаются в один общий желчный проток. По нему желчь поступает в двенадцатиперстную кишку, сюда же по пузырному протоку поступает желчь из желчного пузыря.

Осуществляют **дуоденальное зондирование** с помощью тонкого резинового зонда с оливой на конце, длина зонда около 1,5 м, метки через каждые 10 см.

Зонд вводят утром натощак, в сидячем положении до метки 0,45-0,5 м. Затем пациента укладывают на кушетку без подушки на правый бок, подложив под поясницу валик, чтобы нижняя часть туловища была приподнята.

Когда зонд дошёл до метки 0,8-0,9 м. свободный конец зонда опускают в одну из пробирок штатива, расположенного ниже изголовья пациента.

1-я порция вытекает самостоятельно – это **порция «А» – содержимое двенадцатипёрстной кишки**. Она представляет собой смесь желчи, секретов поджелудочной железы, двенадцатипёрстной кишки и небольшого количества желудочного сока. Порция «А» собирается в течение 10-20 минут.

2-я порция «В» собирается через 5-25 минут после введения через зонд тёплого желчегонного средства, вызывающего сокращение и опорожнение желчного пузыря (сульфат магнезии, пептон, сорбит, оливковое масло) – это **пузырная желчь**.

3-я порция «С» собирается за 10-15 минут после прекращения истечения пузырной желчи – это **печёночная желчь**.

Нормальные показатели

Показатель	Порция «А» дуоденальная	Порция «В» пузырная	Порция «С» печёночная
Количество желчи (мл)	20-25	35-50	Вытекает, пока стоит олива
Цвет	Золотисто-жёлтый Янтарный	Насыщенно-жёлтый, тёмно-оливковый, коричневый.	Светло-жёлтый
Прозрачность	Прозрачная	Прозрачная	Прозрачная
Реакция (рН)	7,0 – 8,0	6,5 – 7,3	7,5 – 8,2
Плотность	1,008 – 1,016	1,016 – 1,034	1,007 – 1,010

Микроскопическое исследование желчи.

Микроскопировать желчь надо сразу же после получения материала. Препараты готовят либо со дна пробирки, либо после просмотра на чашке Петри, из подозрительных комочков и слизи. Можно сделать препарат из осадка после центрифугирования.

В норме желчь почти не содержит клеточных элементов, иногда встречается небольшое количество кристаллов холестерина.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Слизь в виде комочков говорит о
2. Лейкоциты свидетельствуют о
3. Эозинофилы о
4. Эпителий о
5. Кристаллы холестерина скапливаются при
6. Вегетативные формы лямблий, яйца гельминтов – при

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 16. Гематологические исследования.

Цель работы: Подсчет эритроцитов в камере Горяева.

Пипеткой отмерьте 4 мл разводящего раствора (3,5% раствор NaCl) и вылейте в сухую пробирку. Капилляр Сали обработайте раствором цитрата натрия.

Из прокола пальца выпустите свежую каплю крови, приставьте к ней кончик капилляра Сали и наполните его до отметки 0,02. Это соответствует объему 0,02 мл или 20 мкл. Вытрите кончик капилляра и выпустите кровь в пробирку с разводящим раствором. Полученное таким образом разведение крови - 1:200. После тщательного перемешивания раствора крови небольшой каплей заполните подготовленную - с притертым стеклом камеру Горяева. Камеру перед заполнением промойте водой и насухо вытрите. На участок камеры, где нанесены сетки, уложите обезжиренное покровное стекло, при этом нижняя поверхность камеры должна находиться на третьих пальцах обеих рук, двумя вторыми пальцами придерживайте ее спереди. Двумя пальцами притрите покровное стекло, плавно продвигая его по поверхности прямоугольных пластинок до появления цветных колец Ньютона в местах соприкосновения покровного стекла с поверхностью пластинок камеры. Каплю исследуемой жидкости пипеткой поместите перед щелью, образованной покровным стеклом и пластинкой камеры Горяева с нанесенной сеткой. Капля должна заполнить камеру самотеком (под действием капиллярных сил). Следите, чтобы в пространстве над сеткой не было пузырьков воздуха и избытка жидкости. До начала подсчета оставьте счетную камеру на 1 - 2 мин для осаждения форменных элементов. Камеру положите на столик микроскопа и настройте его на малое увеличение (объектив 8 - 9, окуляр 10 или 15). Подсчет производите при несколько опущенном конденсоре. Хорошую контрастность обеспечивает фазово-контрастное устройство. Эритроциты считайте в пяти больших квадратах, состоящих из 16 малых ($5 \times 16 = 80$ малых), расположенных по диагонали. Для записи результатов рекомендуется предварительно расчертить на листе 5 больших квадратов, разлинованных 4x4 и записывать найденное число эритроцитов в каждую клеточку. При подсчете необходимо помнить правило буквы «Г». Подсчитав число эритроцитов в 80 маленьких квадратах (N) рассчитывают число клеток в 1 мкл (мм^3) крови (X). Для этого учитывается разведение в 200 раз, объем камеры над одним маленьким квадратиком $1/4000$ мкл и то, что клетки подсчитывались в 80 таких квадратах. Таким образом, формула для вычисления количества эритроцитов следующая:

$$X = (N \times 4000 \times 200) / 80$$

Полученное количество эритроцитов можно также выразить в количестве на 1 л крови (умножением полученного количества на 10^6), что является стандартной размерностью этого показателя. Рекомендации по оформлению протокола работы. Выводы делаются исходя из того, что в норме количество эритроцитов должно составлять: $3,6-4,5 \times 10^{12}$

кл/л для женщин; $4,5 - 5 \times 10^{12}$ кл/л - для мужчин. После небольшой нагрузки – $5 - 5,5 \times 10^{12}$ кл/л. Сразу после рождения количество эритроцитов составляет около $6,0 \times 10^{12}$ кл/л (колебания в пределах $5,4 - 7,2 \times 10^{12}$ кл/л). С конца первых — начала вторых суток жизни обычно происходит снижение числа эритроцитов в крови, наиболее выраженное на 5 - 7-й день. Минимального значения этот показатель достигает к 2 - 3 мес, а затем несколько увеличивается и в дальнейшем (с 5 - 6-го месяца) поддерживается на уровне взрослых.

Если количество эритроцитов выше нормы, то это явление называется эритроцитоз, а если меньше, то эритропения или анемия. Увеличение количества эритроцитов в крови (эритроцитоз) встречается при гемоконцентрации (ложный эритроцитоз), а также при усилении эритропоэза на фоне неизменной интенсивности гемолиза (истинный эритроцитоз). Уменьшение количества эритроцитов в крови может наблюдаться при гемодилуции (ложная эритропения).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Повышение количества крови говорит о
2. Снижение количества крови говорит о
3. Чему в норме равно количество эритроцитов у мужчин
4. *Что такое гиперхромия? В каких случаях она наблюдается?*
5. *Какие размеры в норме имеет эритроцит? Как называется такой эритроцит?*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 17. Цитологическое исследование в клинической практике. Особенности цитологического исследования заболеваний органов.

Цель работы: Цитологическое исследование мочи

Ход работы

В стерильную пробирку налить 10 мл мочи оценить цвет, прозрачность, запах. Поместить в пробирку с мочёй тест полоску на 2 сек, после выждать 2 мин и поместить тест полоску в анализатор URISCAN и оторвать чек с результатом. Пробирку с мочёй поместить в центрифугу на 1500 об на 10 мин. после того как моча будет отцентрифугированна слить надосадочную жидкость и провести микроскопическое исследование путем нативного препарата. Отмечать наличие форменных элементов осадка мочи в 2-3 полях зрения. Результат записать в лист выдачи анализа.

трактовка результатов

ОАМ учитывает четыре группы показателей: органолептические (внешний вид), физико-химические параметры, содержание в образце различных веществ (биохимическая характеристика) и микробов (микроскопические показатели). Все это должно быть отражено в результатах анализа.

Органолептические показатели

К этой группе относятся цвет, запах, пенистость и прозрачность мочи. В норме образец имеет светло-желтый цвет, почти не пахнет, при взбалтывании образуется легкая пена, которая исчезает за несколько минут. Здоровая моча — прозрачна.

Измененный цвет мочи косвенно указывает на наличие патологий. Так, красная моча может свидетельствовать о кровотечении, моча цвета «мясных помоев» — о гломерулонефрите, моча цвета пива — о желтухе, а черная моча — о заболеваниях обмена веществ. Если моча резко пахнет ацетоном — это признак запущенного сахарного диабета, затхлый запах у новорожденных наблюдается при фенилкетонурии, а резкий запах аммиака — при цистите. Мутная моча говорит об инфекции выделительной системы, а пенится образец из-за высокой концентрации белка.

Физико-химические показатели

Дополнительно в лаборатории оценивают относительную плотность и степень кислотности (уровень pH) мочи.

Плотность мочи — крайне важный параметр при диагностике почечной недостаточности. Дело в том, что из-за нарушения работы почек с жидкостью из организма перестают выводиться соли и другие химические вещества, поэтому плотность снижается. Если же по каким-то причинам в моче содержится белок или сахар, плотность ее, наоборот, растет. Нормальное значение плотности для людей всех возрастов — 1010–1024 г/л.

Важно знать! Утренняя порция мочи в норме обладает самой высокой плотностью, поскольку она концентрируется в течение ночи. Вечерняя моча должна быть более жидкой. Если параметры плотности в вашем общем анализе мочи будут отличаться от нормы, врач дополнительно назначит анализ суточной мочи, который позволит сравнить плотность в разных ее порциях.

Кислотность мочи изменяется при патологии почечных канальцев, при воспалительном процессе выделительной системы и при некоторых особенностях диеты (мясная пища делает мочу более кислой, а растительная — щелочной). В норме pH в ОАМ составляет 5,0–7,0 у новорожденных и 5,0–8,0 у детей и взрослых.

Биохимические характеристики

В норме моча не содержит глюкозы, билирубина, гемоглобина и нитратов, а белок, уробилиноген и кетоновые тела определяются только в следовых количествах.

Глюкоза в моче наблюдается у людей с сахарным диабетом, а также при остром панкреатите, инфаркте и употреблении в пищу большого количества углеводов незадолго до анализа. Гемоглобин (или близкий по составу белок миоглобин) может появиться в образце вследствие интоксикации, после переливания крови или в результате повреждения мышц при чрезвычайно интенсивных физических нагрузках. Нитраты часто обнаруживаются в ОАМ у пожилых людей при инфекциях выделительной системы.

Уробилиноген в моче, как правило, сигнализирует о серьезных проблемах с печенью, а кетоновые тела — признак запущенного сахарного диабета: иногда именно их наличие в моче дает основание поставить диагноз.

Белок в моче у взрослых и у детей — повод для беспокойства. Такая ситуация бывает при повреждении мембраны почек, которая в норме не должна пропускать крупные молекулы. Это характерно для таких заболеваний, как гломерулонефрит, диабетическая нефропатия, миеломная болезнь, хроническая почечная недостаточность и т.д. Также белок в моче может кратковременно повыситься вследствие распада тканей в организме — при обширных травмах, ожогах и инфаркте миокарда.

Это интересно! В редких случаях белок в моче объясняется физиологической протеинурией. Чаще всего она диагностируется у солдат («маршевая протеинурия»), у подростков («ортостатическая протеинурия») и у людей, переживших сильный стресс или переохлаждение. Если накануне сдачи ОАМ вы целый день провели на ногах, лучше перенесите анализ на другую дату.

Микроскопические показатели

В завершение анализа мочу исследуют под микроскопом. В ней могут обнаруживаться форменные элементы — эритроциты и лейкоциты, а также эпителиальные клетки из мочевыделительного тракта, осадок и цилиндры — измененные клетки, появляющиеся при некоторых патологических состояниях.

Эритроциты в общем анализе мочи говорят о мочекаменной болезни, пиелонефрите, туберкулезе почек, опухолях выделительной системы, гипертонии, отравлениях и других опасных нарушениях здоровья. Большое количество лейкоцитов подразумевает воспалительную реакцию. Плоские эпителиальные клетки (до 5 в поле зрения) наблюдаются в норме, но значительное количество переходного или почечного эпителия свидетельствует о неполадках в работе почек или мочевого пузыря.

Цилиндры — слепки почечных канальцев — содержат различные вещества, и по их составу врач определит, с чем связано появление таких аномальных включений. Как

правило, цилиндры появляются в общем анализе мочи при болезнях почек, повышенном артериальном давлении, лихорадке и амилоидозе. Кристаллы соли в моче указывают на мочекаменную болезнь, камни в почках или подагру. Бактерий и дрожжей в ОАМ быть не должно. Их выявление — повод для консультации с терапевтом или нефрологом. Несложно заметить, что общий анализ мочи позволяет делать выводы не только о состоянии почек, мочевого пузыря и других органов выделительной системы, но и дает ценную информацию о прочих возможных отклонениях в работе организма. Поэтому с вниманием относитесь к результатам такого исследования — даже безо всяких симптомов недуга, оно позволит вовремя начать лечение скрытой патологии.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Исследование мочи не позволяет определить
2. В направлении на анализ мочи нужно указать:
3. Каким термином называется повышение удельного веса мочи?
4. Кто определяет суточный диурез в условиях стационара?
5. *Какие данные не получают при сборе мочи по Нечипоренко?*
6. *Какой емкости баночка нужна для сбора мочи по Нечипоренко?*
7. *Как правильно собирать мочу по Зимницкому?*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 18. Биологические маркеры опухолей

Цель работы: лабораторная диагностика опухолевого маркера α -Фетопротеина.

Клинически-значимые опухолевые маркеры. α -Фетопроtein (АФП) АФП представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 70000 дальтон. АФП является физиологическим продуктом желточного мешка, печени и желудочно-кишечного тракта плода. В сыворотке плода АФП обнаруживается с 4-й недели беременности. Его концентрация достигает пика между 12-й и 16-й неделей и затем постепенно снижается вплоть до рождения. В возрасте 1 года нормальный уровень АФП в сыворотке такой же, как у взрослых, т.е. менее 15 нг/мл. АФП является основным белком плодной сыворотки, у взрослых содержание АФП в сыворотке крови незначительно. Определение АФП в сыворотке крови используется для первичной диагностики и мониторинга гепатоцеллюлярного рака печени, эмбрионально-клеточных опухолей яичников и яичек, тератом и тератокарцином любой локализации. Определение АФП в сыворотке крови беременных женщин или в амниотической жидкости в период с 15 до 20 недели служит одним из лабораторных методов выявления тяжелой врожденной патологии плода — синдрома Дауна и дефектов нервной трубки. Концентрация АФП, продуцируемого эмбриональными карциномами, очень высока. Клетки дисгерминомы яичников содержат также элементы синцитиотрофобласта, и поэтому наряду с АФП в них синтезируется хорионический гонадотропин. Оба этих маркера используются для дифференциальной диагностики дисгермином. Уровень АФП выше 500 нг/мл (400 МЕ/мл) можно расценивать как патологический. Именно такая концентрация АФП характерна для дисгерминомы, гепатобластомы (детский вариант гепатоцеллюлярной аденокарциномы). При метастазах в печень опухолей, отличных от перечисленных, повышение уровня АФП, как правило, не наблюдается. АФП можно рассматривать в качестве «абсолютного маркера» для диагностики эмбриональных карцином и опухолей желточного мешка, тем не менее уровень АФП более 400 МЕ/мл наблюдается лишь у 80–90 % детей с указанными опухолями. У взрослых с гепатоцеллюлярной аденокарциномой в 50 % случаев уровень АФП превышает 800 МЕ/мл. Период полувыведения АФП — 5 дней, что позволяет использовать этот маркер для оценки эффективности химиотерапии. Большое значение имеет динамический контроль за уровнем АФП у пациентов групп риска. Население Южной и Восточной Африки, Южной и Средней Азии считаются популяциями высокого риска по гепатоцеллюлярной аденокарциноме. Скрининг по АФП позволяет эффективно выявлять это заболевание до возникновения клинических

признаков, повышая тем самым эффективность лечения. Лабораторные маркеры онкологических заболеваний. Часть 1. опс 101 7 Повышенный уровень АФП определяется также приблизительно у 9 % пациентов с метастатическим поражением печени при злокачественных опухолях молочной железы, бронхов и колоректальной карциноме. Однако уровень АФП у таких пациентов редко превышает 100 нг/мл и практически никогда 500 нг/мл. У большинства из них выявляется очень высокий уровень РЭА, вследствие чего сочетание определения АФП и РЭА дает возможность для дифференциации данного типа патологии от первичной гепатоцеллюлярной карциномы. Повышенный уровень АФП обнаруживается и при таком доброкачественном заболевании, как гепатит, однако повышение, как правило, носит временный характер и находится в области низких значений патологического диапазона (очень редко превышает уровень 500 нг/мл). Такие АФП-позитивные пациенты имеют большую вероятность возникновения гепатоцеллюлярной карциномы и худший пятилетний прогноз. Уровень АФП (в МЕ/мл) при некоторых патологиях: гепатоцеллюлярная карцинома >800; гепатобластома (дети) >400; тератобластома семенников >500; дисгерминома яичников >1000; метастазы в печени >10; гепатит в и С 10–50; острые отравления до 100. Наборы реагентов ООО «ХЕМА» для иммуноферментного определения α -фетопротейна в сыворотке (плазме) крови. Набор «АФП-ИФА» – каталожный номер K225 Характеристики набора: 1. Число определений: 96 2. Объем пробы, мкл: 50 3. Чувствительность: 2 Ед/мл 4. Количество стадий: 1 5. Время постановки: 80 мин. 6. Температура инкубации: +37 °С

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

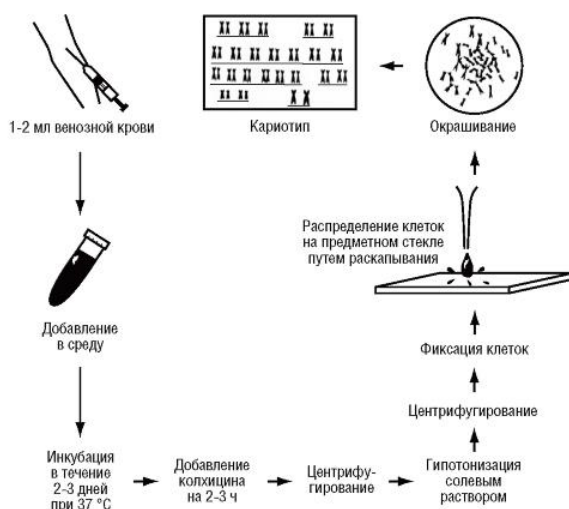
1. Что представляет собой исследование на ОМ?
2. Какие виды рака можно заподозрить?
3. Некоторые считают анализ на ОМ чуть ли не единственной возможностью раннего выявления рака?
4. Кому показан анализ на ОМ?
5. Целесообразно ли делать анализ без рекомендации врача, на всякий случай?
6. *Обнаруживаются ли ОМ у здорового человека?*
7. *Следует ли тестировать на ОМ беременных?*
8. *Как подготовиться к исследованию, чтобы минимизировать вероятность ложноположительного и ложноотрицательного результата?*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 19. Лабораторная генетика

Цель работы: получение препаратов митотических хромосом.

Первое условие цитогенетической диагностики - **наличие делящихся клеток в материале для цитологического исследования.** Костный мозг, ткани семенника и хорион имеют достаточный митотический индекс для использования в цитогенетике. Однако, как показал опыт, несравненно информативнее исследование на культурах клеток: клетки освобождены от элементов соединительной ткани и хорошо суспендируются. Митотический индекс в культуре клеток много выше, чем в тканях организма. Культуры клеток можно получать из кусочков кожи (растут фибробласты), костного мозга, эмбриональных тканей, хориона, клеток амниотической жидкости. Наиболее удобным объектом для медицинских генетиков оказалась культура лимфоцитов периферической крови (рис. 9.2).

Ход работы. Для ее получения достаточно взять 1-2 мл венозной



крови и добавить ее в смесь питательной среды с фитогемагглютинином (белок бобовых растений). Он вызывает иммунную трансформацию и деление лимфоцитов. Продолжительность культивирования составляет 48-72 ч. Вторым методическим условием цитогенетических исследований является **использование колцемида** (или колхицина), разрушающего веретено деления и останавливающего клеточное деление на **стадии метафазы**. Колцеמיד добавляют в культуры клеток за 2-3 ч до окончания культивирования: митотический индекс в культуре клеток за 2-3 ч повышается в 2-3 раза. Даже без культивирования экспозиция с колцеמידом увеличивает число метафаз. Хромосомы в присутствии колцемида укорачиваются в результате продолжающейся конденсации, следовательно, в препарате они легче отделяются одна от другой.

Если необходим детальный анализ определенного района хромосомы, сильно конденсированные хромосомы на стадии метафазы (метод называется метафазным) непригодны для анализа. Клетку нужно зафиксировать на стадии, предшествующей метафазе, когда хромосома редуцировалась, но еще не полностью конденсировалась. Это стадия прометафазы. Хотя хромосомы на стадии прометафазы плохо разъединены (они еще очень длинные), и в препарате много наложений одной хромосомы на другую, что, безусловно, затрудняет анализ, все же в отдельных клетках можно найти нужный участок, пригодный для анализа. Этот метод (или подход), в отличие от метафазного метода, называют **прометафазным**, или методом **высокоразрешающей цитогенетики**. Суть модификации метода состоит в прекращении процесса спирализации и конденсации хромосом в профазе с помощью препаратов, например метатрексата, которые вводят в культуру клеток за несколько часов до фиксации.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. По аутосомно-рецессивному типу наследуются:
2. Если оба супруга, имеют группу крови АВ, то у них не может быть детей с группой крови:
3. Тип наследования гемофилии:
4. Тип наследования болезни Вильсона-Коновалова:
5. Явление, при котором фрагмент одной хромосомы присоединяется к поврежденному концу другой, носит название:

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 20.

Коагулологические исследования

Цель работы: освоить принципы и методы исследований гемостаза

Активированное частичное (парциальное) тромбопластиновое время

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА Определяют время свертывания бедной тромбоцитами цитратной плазмы при физиологической температуре (37 °С), в условиях стандартной активации контактной фазы, в присутствии фосфолипидов и при добавлении ионов Ca^{2+} . Заменителем тромбоцитарной фосфолипидной матрицы для сборки коагуляционных ферментных комплексов служат фосфолипиды мозга, эритроцитов или сои, заменителем активационной контактной поверхности — каолин или эллаговая кислота. Благодаря отсутствию тромбоцитов в плазме и добавлению их заменителя — парциальной тромбопластина — на результаты теста практически не влияют тромбоцитарные факторы. Возможно определение активированного частичного тромбопластинового времени на портативных коагулометрах со специализированными картриджами. Иногда тест обозначают как активированное парциальное тромбопластиновое время активированного частичного тромбопластинового времени, что является аналогом активированного частичного тромбопластинового времени.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ Соблюдают общие условия взятия венозной крови для исследования гемостаза (с добавлением цитрата) и получения бедной тромбоцитами плазмы. Параметры активированного частичного тромбопластинового времени стабильны до 4 ч при комнатной температуре; при лечении гепарином исследование необходимо провести в течение 1 ч после взятия материала. Возможно хранение замороженной бедной тромбоцитами плазмы до 10-20 дней, но допустимо лишь однократное размораживание.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ Составляют 20-45 с. Результаты теста активированного частичного тромбопластинового времени зависят от точности соотношения кровь/цитрат, вида и свойств фосфолипидного компонента и каолина (или эллаговой кислоты), температуры, а также от способа регистрации результатов, типа и чувствительности прибора, вида и активности реагентов, а также от типа оборудования. Каждой лаборатории рекомендуют определить свои, локальные значения нормы.

Для снижения влияния интерферирующих факторов возможна оценка результата в виде индекса активированного частичного тромбопластинового времени, диапазон нормальных значений которого составляет 0,8-1,2: индекс АЧТВ = АЧТВ пациента / АЧТВ контрольной нормальной плазмы.

Протромбиновое время

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТА Исследование протромбинового времени представляет важнейший скрининговый тест для оценки системы свертывания крови. Определяют время образования фибринового сгустка в бедной тромбоцитами цитратной плазме при активации внешнего пути гемостаза тканевым тромбопластином, содержащим тканевый фактор и фосфолипиды, в присутствии ионов Ca^{2+} при 37 °С. Источником тромбопластина могут быть эритроциты, ткани мозга или другие ткани; может быть использован и рекомбинантный тромбопластин. Возможно определение протромбинового времени цельной крови на портативных коагулометрах со специальными картриджами.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ Соблюдают общие условия взятия венозной крови для исследования гемостаза. Оптимальным является исследование венозной крови. Капиллярная кровь менее пригодна для определения протромбинового времени, поскольку содержит непредсказуемое количество тканевого фактора, попадающего в нее при проколе пальца, что создает определенные проблемы (в частности, в педиатрии). Капиллярную кровь имеет смысл исследовать при наличии специальных портативных коагулометров, в которых время образования сгустка выражается в пересчете на эквивалент венозной

крови и используются картриджи с реагентами, сводящими к минимуму влияние «собственного» тканевого фактора. Кровь из пальца берут непосредственно перед анализом, избегая давления на мягкие ткани; первую каплю удаляют ватным тампоном. Взятую кровь смешивают с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1, капилляр для взятия предварительно промывают тем же раствором цитрата. Результаты теста протромбинового времени остаются стабильными до 24-48 ч при хранении венозной крови с цитратом при комнатной температуре в закрытых первичных вакуумных пробирках. При работе с открытыми пробирками требуется отделить плазму от клеток в течение 60 мин и провести определение протромбинового времени в течение 2-4 ч после взятия крови. Полученную плазму до исследования хранят при комнатной температуре; охлаждение до 4 °С более чем на 24 ч может привести к Холодовой активации фактора VII и уменьшению протромбинового времени. **Ход работы:** Исследуемую плазму прогревают до 37 °С, вносят тромбопластиновый реагент с кальция хлоридом и определяют время образования фибринового сгустка (на коагулометре или вручную). При определении протромбинового времени капиллярной крови используют тот же принцип, но применяют реагенты с иной концентрацией действующих веществ, а измерение проводят вручную или на коагулометре с механическим принципом регистрации (желательно в параллельных пробах с вычислением среднего результата).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Показания к назначению гемостазиограммы
2. Какие заболевания определяться с помощью данных анализов
3. *Объяснить принцип метода АЧТВ,ПТИ*
4. *Референтные значения*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 21.

Лабораторная диагностика неотложных состояний

Цель работы: освоение диагностики неотложных состояний

Любое вмешательство в организм больного в той или иной степени приводит к нарушению гомеостаза. Особенно четко указанные нарушения проявляются при крупных хирургических вмешательствах, а также у больных в отделениях интенсивной терапии как результат развития послеоперационных осложнений, в связи с проявлением какой-либо другой патологии, внезапным заболеванием или тяжелой травмой. Правильная и своевременная лабораторная диагностика и лабораторное заключение позволяют выбрать и провести адекватную терапию, определяющую исход лечения больных.

Критическое (неотложное) состояние - это крайняя степень любой, в том числе ятрогенной, патологии, при которой необходима интенсивная медикаментозная поддержка жизненно важных функций организма или их искусственное замещение. Анестезиология и реаниматология являются основными медицинскими дисциплинами, призванными обеспечивать защиту организма в экстремальных условиях, обе дисциплины включают обязательный лабораторный контроль адекватности проводимой терапии у больных в критическом состоянии. Это обстоятельство способствовало созданию лаборатории экспресс-диагностики, осуществляющей проведение экспресс-анализов для оценки состояния пациента в условиях острых воздействий на организм повреждающих факторов - синдромальной диагностики. В отличие от других клинических лабораторий, лаборатория экспресс-диагностики непосредственно участвует в активном лечебном процессе, управляя теми или иными действиями

клиницистов: анестезиологов - в операционной или реаниматологов - в отделении интенсивной терапии. При этом одним из основных условий успешной работы лаборатории экспресс-диагностики является ее размещение в операционных и отделениях интенсивной терапии, что способствует быстрому (не более 5 мин) получению клиницистом анализов для подбора необходимых методов терапии.

Системы, которые наиболее быстро и остро нарушаются у больных в критическом состоянии и имеют жизненно важное значение:

кислородный баланс;кислотно-основное равновесие крови;водно-электролитный баланс гемостаза; гемореология.

Контролем этих систем определяется спектр основных лабораторных показателей, которые необходимо исследовать у больных в неотложном состоянии.

Кислородный статус крови: sO_2 , pO_2 , Hb и его фракции (FHbO₂, HbCO, MetHb), общее содержание O₂, $p50$.

Кислотно-основное равновесие крови: pH, pCO_2 , HCO₃, SB, BE.

Основные метаболиты: лактат, глюкоза.

Электролитный баланс: калий, натрий, кальций, магний, хлор, остаточные (резидуальные -R) анионы.

Водный баланс: осмоляльность плазмы и мочи, коллоидно-осмотическое давление плазмы.

Показатели свертывающей системы крови: обязательные - время свертывания по Ли-Уайту, протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время, АЧТВ, фибриноген, количество и функция тромбоцитов; уточняющие - антитромбин, ПДФ, РФМК, D-димер и др.

Показатели реологии крови: вязкость крови и плазмы, скорость оседания эритроцитов с определением их функциональных свойств.

При развитии у больных шока любой этиологии, органной или полиорганной недостаточности не менее важными являются дополнительные исследования, такие как:

общий анализ крови;

основной ферментативный спектр крови: АСТ, АЛТ, ЛДГ, панкреатическая амилаза, тропонин, КФК, МВ-фракция КФК, ЩФ и др.;

биохимические показатели крови - количество белка и альбумина, глюкозы, билирубин и др.;

показатели функционального состояния почек - креатинин и мочевина крови и мочи с расчетом клубочковой фильтрации;

токсины - концентрация средних молекул и активация свободных радикалов кислорода.

Нарушение гомеостаза наиболее часто происходит при крупных хирургических вмешательствах и в отделении интенсивной терапии, что обусловлено последствиями операционного или другими видами стресса. Кроме того, в отделениях интенсивной терапии могут отмечаться самостоятельные нарушения гомеостаза у больных, не связанные с оперативным вмешательством.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. При остром панкреатите наблюдается
2. К методам срочной лабораторной диагностики следует отнести

3. *Подозревая алкогольное поражение печени, целесообразно определять*
4. *Для гипергликемической комы характерны*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 22.

Химико-токсикологический анализ

Цель работы: рассмотреть особенности проведения токсикологических анализов.

Условия развития современного общества требуют создания нового подхода к анализу биологически активных веществ и загрязнителей окружающей среды. Задача достоверного обнаружения и количественного определения широкого круга веществ различной химической природы в часто кардинально отличающихся друг от друга по своим свойствам и характеристикам объектах при условии дефицита времени может решаться исключительно с привлечением нескольких современных химических, иммунохимических и физико-химических методов исследования, результаты которых взаимно дополняют и уточняют друг друга. Химико-токсикологический анализ (ХТА) - систематическое аналитическое исследование. Целью ХТА являются идентификация токсикантов и определение их концентрации в биологических объектах. Каждое исследование, проведенное судебным химиком-экспертом, имеет юридические последствия.

Достоверность и надежность полученных результатов определяются правильностью организационных мероприятий (отбор пробы, хранение проб, постоянный контроль за работой оборудования, чистотой реагентов и др.), чувствительностью и специфичностью используемых методов, знанием природы и метаболизма вещества (см. 5.8).

Различают (условно) несколько направлений ХТА, каждое из которых имеет свои задачи и некоторые особенности (табл. 5-1).

ХТА имеет судебно-правовую направленность, которая заключается в том, что юридические вопросы решаются биоаналитическими методами, а полученный результат на конечной стадии преобразуется в юридический ответ.

Существуют три варианта проведения ХТА в зависимости от конкретных обстоятельств дела, клинических, криминалистических и других ситуаций.

1. Анализ объектов, содержащих известные токсичные вещества (в некоторых случаях даже известна доза попавшего в организм токсиканта), называют «направленным», например проведение ХТА в клинических лабораториях для контроля за выведением ксенобиотика, ходом лечения и т.д., т.е. случай, когда известны обстоятельства дела.

2. Наличие косвенных сведений, указывающих на возможную причину отравления, гипотезы о химической природе токсичного вещества, построенная на основе клинической картины отравления пострадавшего и/или результатов патологоанатомического вскрытия трупа, обуславливают некоторые изменения в методических подходах, применяемых в «направленном» ХТА.

Вид анализа	Цель анализа	Задачи анализа	Особенности анализа
Судебно-химический анализ (СХА)	Установление причин смерти или покушения на жизнь как составная часть судебно-медицинской экспертизы	Идентификация и количественное определение вещества, вызвавшего отравления Судебно-правовая оценка отравления	Характер биообъектов Многообразие токсикантов Различное распределение токсикантов по органам и тканям Наличие мешающих агентов Степень разложения трупного материала (вторичный метаболизм)
Клинико-токсикологический анализ (КТА)	Диагностика отравления для выбора метода лечения	Идентификация и количественное определение вещества, вызвавшего отравление	Экспресс-анализ Установление корреляции между терапевтической и токсической дозой
Анализ наркотических средств (АНС)	Установление факта присутствия наркотических средств в биосубстратах человека, количественное определение токсикантов (согласно законодательству РФ)	Идентификация и количественное определение (не всегда) средства, вызвавшего наркотическое одурманивание	Возможность сокрытия факта употребления наркотических средств Возможность фальсификации пробы Возможность использования нескольких наркотических или одурманивающих средств одновременно (проявление синергизма и антагонизма токсикантов)
Допинг-анализ	Установление факта присутствия в биосубстратах человека вещества, запрещенного Всемирной антидопинговой организацией (WADA), или свидетельства его использования	Идентификация и количественное определение запрещенного вещества и его метаболитов	Возможность сокрытия факта употребления запрещенного средства Возможность фальсификации пробы Возможность использования нескольких запрещенных средств одновременно Многообразие потенциальных допингов Терапевтическая доза Высокая чувствительность методов анализа

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Характеристика токсикологической группы веществ "летучие яды"
2. Особенности различных видов отравлений.
3. Укажите основные направления использования химико-токсикологического анализа
4. Укажите объекты исследования (вещественные доказательства) при химико-токсикологических исследованиях

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 23.

Терапевтический лекарственный мониторинг

Цель работы:

Единственным принципиальным отличием постоянного введения лекарства в организм от его дискретного назначения является постоянное непрерывное поступление вещества в организм, поэтому, естественно сделать вывод, что все закономерности, которые мы установили для дискретного введения будут иметь место и в случае непрерывной инфузии:

- Время достижения стационарной концентрации лекарства составляет $4-5t_{1/2}$ и не зависит от скорости инфузии (величины вводимой дозы).

- При увеличении скорости инфузии (вводимой дозы) величина C_{ss} также увеличивается в пропорциональное число раз.
- Элиминация лекарства из организма после прекращения инфузии занимает $4-5t_{1/2}$.

Однако, благодаря тому, что лекарство поступает в организм человека непрерывно, его концентрация при введении изменяется не ступенчато (как при дискретном введении), а плавно. Кроме того, отсутствует колебание концентрации в стационарном состоянии, поэтому определение максимальной и минимальной границы колебаний C_{ss} теряет свой смысл.

Терапевтический лекарственный мониторинг

Терапевтическим лекарственным мониторингом называют обеспечение оптимального терапевтического эффекта лекарства путем управления его концентрацией в сыворотке крови. Терапевтический лекарственный мониторинг исходит из положения о том, что оптимальное действие лекарства реализуется в том случае, если его уровень в крови находится в диапазоне терапевтических концентраций.

Прежде чем перейти к обсуждению принципов терапевтического лекарственного мониторинга следует остановиться на вопросе об уместности его применения:

<i>Мониторинг не приемлем</i>	<i>Мониторинг необходим</i>
• Если лекарство можно дозировать путем четкого измерения его эффекта: ○ Гипотензивные средства дозируют мониторируя уровень АД; ○ Сахаропонижающие средства при диабете дозируют мониторируя уровень глюкозы крови. • Если концентрация лекарства не коррелирует с его эффектом. Например, в том случае, если лекарственное средство необратимо инактивирует фермент или рецептор. При этом лекарство может быть уже выведено, но его эффект сохраняется. Так действуют некоторые противоопухолевые средства. • Если при заболевании возможно непредсказуемое изменение параметров фармакокинетики. Например, при инфаркте миокарда изменяется уровень кислого α_1-гликопротеина и доля связанных с ним основных лекарств.	• Если концентрация лекарства четко коррелирует с его фармакологическим эффектом, который трудно измерить количественно с высокой точностью. • Если желаемое действие лекарства связано с подавлением спорадических приступов болезни (приступы судорог, аритмии). • Если диапазон между терапевтическим и токсическим уровнем лекарства узкий (например, у дигоксина он отличается всего в 2 раза). • Чтобы проверить добросовестность соблюдения пациентом врачебных назначений.

Терапевтический лекарственный мониторинг включает в себя контроль за терапевтической концентрацией лекарства в крови и коррекцию нагрузочной и поддерживающей доз в зависимости от полученных данных о концентрации лекарства.

1. **Контроль за терапевтической концентрацией лекарства.** Если лекарственное средство имеет короткий период полуэлиминации, то необходимо определить концентрацию лекарственного средства дважды – на ее пике (т.е. через 5-10 мин

после введения в вену) и на ее минимуме (т.е. непосредственно перед следующей инъекцией). Если лекарство имеет длительный период полуэлиминации (более 6-8 ч), то можно ограничиться единичным измерением концентрации перед очередным введением лекарства (т.е. в области ее минимума).

2. **Коррекция нагрузочной дозы лекарства.** Если после введения пациенту нагрузочной дозы ожидаемая терапевтическая концентрация ($C_{\text{тер, ожид}}$) не была достигнута, то необходимо рассчитать дополнительную нагрузочную дозу, которая составляет:

$$D_n = V_d \times (C_{\text{тер, ожидаемая}} - C_{\text{тер, реальная}})$$

3. **Коррекция поддерживающей дозы лекарства.** Для коррекции поддерживающей дозы, если желаемую терапевтическую концентрацию не удастся удерживать, используют соотношение:

$$\frac{C_{\text{тер, реальная}}}{C_{\text{тер, желаемая}}} = \frac{D_{\text{п, прежняя}}}{D_{\text{п, новая}}}, \text{ отсюда } D_{\text{п, новая}} = \frac{C_{\text{тер, желаемая}}}{C_{\text{тер, реальная}}} \times D_{\text{п, прежняя}}.$$

4. **Коррекция дозы лекарства в зависимости от степени нарушения функции органов элиминации.** Заболевания почек или сниженный сердечный выброс обычно приводят к уменьшению клиренса лекарств, которые выводятся почками. При коррекции дозы обычно исходят из предположения, что степень снижения экскреции лекарства пропорциональна степени снижения клиренса креатинина:

$$\frac{D_{\text{корректированная}}}{D_{\text{обычная}}} = \frac{Cl_{\text{креатинина, пациента}}}{100 \text{ мл / мин}}, \text{ тогда } D_{\text{корректированная}} = \frac{Cl_{\text{креатинина, пациента}}}{100 \text{ мл / мин}} \times D_{\text{обычная}}.$$

Данный подход непригоден, если лекарство элиминируется почечным и внепочечным путями. В этом случае следует учитывать долю лекарства, которое элиминируется внепочечным путем:

$$D_{\text{корректированная}} = D_{\text{обычная}} \times f_{\text{внепочечная}} + D_{\text{обычная}} \times \frac{Cl_{\text{креатинина, пациента}}}{100 \text{ мл / мин}} \times f_{\text{почечная}}$$

Например, элиминация амоксициллина на 10% осуществляется печенью и на 90% - почечным путем. Если у пациента клиренс креатинина составляет 25 мл/мин (снижен на $\frac{3}{4}$) то искомая доза лекарства для него:

$$D_{\text{корректированная}} = 500 \text{ мг} \times 0,1 + 500 \text{ мг} \times \frac{25 \text{ мл / мин}}{100 \text{ мл / мин}} \times 0,9 = 50 \text{ мг} + 112,5 \text{ мг} = 162,5 \text{ мг}.$$

В общем случае, процесс терапевтического лекарственного мониторинга должен включать в себя последовательное выполнение следующих этапов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Выбрать целевую концентрацию лекарства (обычно она указана в справочной литературе).
2. На основании данных о V_d и Cl рассчитать поддерживающую и нагрузочную дозы лекарства, после чего ввести их.

3. Зарегистрировать реакцию пациента и определить концентрацию лекарства в плазме крови.
4. Если реакция пациента или уровень лекарства у него в организме отличаются от ожидаемых, пересчитать показатели V_d и Cl и повторить этапы 2 и 3 с учетом данных пересмотра.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 24.

Лабораторная иммунология

Цель работы: Освоение работы на анализаторах:

- освоение работы на фотометре по программам «Качественный метод определения антител» и «Количественный метод определения антител» на примере определения антител к тиреоглобулину (ТГ);
- ввод маркировки образца;
- проведение дозирования раствора одно- и многоканальным дозатором в разных объемах. После выполнения заданий приборы выключить, провести обработку поверхностей приборов и дозаторов дезинфицирующим средством.

Использованную посуду, наконечники, остатки клеточной суспензии, сыворотки обработать согласно требованиям санэпидрежима.

Освоение принципов приготовления реактивов

Приготовление реактивов к конкретным методикам будет указано в соответствующих практических занятиях.

Приготовление физраствора (изотонический раствор NaCl): физиологический раствор 0,9 %-ный, pH 7,0-7,2: взвесить на аналитических весах 9 г химически чистого хлорида натрия (NaCl), растворить его в небольшом количестве дистиллированной воды и довести объем до 1 л дистиллированной водой; измерить pH полученного раствора на ионометре. Доведение pH до нужных показателей проводится одномолярным раствором HCl (1 моль/л) или NaOH. Хранится физраствор при комнатной температуре.

Приготовление антикоагулянтов

Раствор гепарина с концентрацией 200 ЕД/мл: к 1 мл исходного раствора гепарина (коммерческий), содержащего 5000 Ед/мл гепарина, добавить 24 мл стерильного физиологического раствора pH 7,2.

Хранить при + 4 °С.

Конечная концентрация в смеси с кровью 20 Ед/мл (10 мл крови + 1 мл гепарина с содержанием 200 Ед/мл, или 0,1 мл гепарина + 1 мл крови).

2,7 и 6 %-ные растворы ЭДТА (трилон Б) – динатриевая соль

этилендиаминтетрауксусной кислоты – Na ЭДТА: взвесить 2,7 г

ЭДТА и 6 г ЭДТА; растворить каждую навеску в 100 мл стерильного физиологического раствора pH 7,2. Хранить при + 4 °С. Учитывая, что ЭДТА способствует снижению экспрессии CD4, а гепарин угнетает фагоцитоз, в клинической лабораторной иммунологии используют смесь гепарина и ЭДТА. **Смесь гепарина и ЭДТА:** смешать 1 ч. гепарина с содержанием 200 ЕД/мл с 2 объемами 6 %-ного ЭДТА. Хранить при + 4 °С. Используют в соотношении 1:10 с кровью (1 мл антикоагулянта + 10 мл крови).

10 Приготовление цитратного гемостабилизатора (для предотвращения агрегации тромбоцитов)

Взвесить 13,2 г цитрата натрия (хч), 4,8 г лимонной кислоты (хч), 25 г глюкозы (хч); довести до 1 л стерильной дистиллированной водой. Оптимальное значение pH 6,5.

Хранить при + 4 °С. Используется в соотношении к лейкоцитарной взвеси 1 : 7. Записать основные моменты занятия и этапы лабораторных иммунологических

исследований.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Техника безопасности при работе в лаборатории.
2. Утилизация биоматериала.
3. Преаналитический этап иммунологических исследований.
4. Прием биоматериала, требования к его качеству, обработка крови, получение и хранение проб сыворотки крови.
5. *Приготовление цитратного гемостабилизатора.*
6. *Приготовление антикоагулянтов.*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 25. Диагностика аутоиммунных заболеваний

Целый ряд особенностей отличают методы обнаружения аутоантител от оценки содержания других биологических молекул в биологических жидкостях, поэтому ряд аспектов диагностического использования аутоантител требует отдельного освещения.

Аутоантитела представляют собой иммуноглобулины классов IgG, IgA, IgM, специфически связывающиеся с антигенными эпитопами молекул человеческого организма. Появление аутоантител представляет собой нормальный биологический феномен, а связывание иммуноглобулинов с собственными антигенами можно выявить в сыворотке любого человека. В норме существует охарактеризованная популяция CD5⁺ В-клеток, синтезирующая полиреактивные низкоаффинные иммуноглобулины, способные связываться со многими антигенами. Роль аутоантител в норме и причина их появления изучена недостаточно. Вероятно, что причиной образования аутоантител является перекрестная реактивность иммуногенных эпитопов между антигенами инфекционных агентов и собственными молекулами организма. Спектр антигенных стимулов, окружающих человека, постоянно меняется, что ведет к образованию низкоаффинных непатогенных аутоантител.

Аутоантитела отмечаются при инфекционных и онкологических заболеваниях, воспалительных процессах различного генеза, хронических интоксикациях (алкоголизме), либо на фоне приема лекарственных препаратов. Появление ревматоидного фактора при инфекции вирусом гепатитом С, антимиокардиальных антител при вирусных миокардитах указывают на большое значение инфекции в генезе аутоиммунных процессов. Встречаемость антинуклеарных антител несколько возрастает у пациентов с онкологическими заболеваниями, причем индукция антинуклеарных антител на фоне опухоли указывает на лучший прогноз у онкологических больных. Встречаемость ряда аутоантител, в частности ревматоидного и антинуклеарного фактора, нарастает в пожилом возрасте. Однако, титры аутоантител, присутствующих в норме, низки и сравнительно нестойки с течением времени.

Возможность использования конкретной разновидности аутоантител в качестве диагностического показателя определяется их встречаемостью при аутоиммунном заболевании. Встречаемость тех аутоантител, которые используются для клинической диагностики, обычно составляет более 60-70% при патологии, менее 1% в норме и других заболеваниях. Хорошие клинико-лабораторные параметры многих разновидностей аутоантител позволяют рассматривать их в качестве лабораторных маркеров этих заболеваний, то есть высокоспецифичных лабораторных тестов,

обладающих исключительной диагностической информативностью. Высокоспецифичными серологическими маркерам называют те разновидности аутоантител, которые встречаются исключительно при этом заболевании. Так к высокоспецифичным серологическим маркерам относят анти-дсДНК и анти-Sm - при СКВ, антитела к Scl-70 антигену при склеродермии. Некоторые аутоантитела могут одновременно быть высокоспецифичными маркерами нескольких групп заболеваний. Например, антитела к цитоплазме нейтрофилов отмечаются как при гранулематозных васкулитах, так и воспалительных заболеваниях кишечника. Ряд аутоантител, характерных для аутоиммунных заболеваний, сравнительно часто отмечаются у нормальных лиц без признаков аутоиммунного заболевания, что значительно ограничивает их диагностическое использование. Так клиническое использование антител к скелетным мышцам при миастении или антител к миокарду ограничено, так как они часто могут отмечаться в норме либо при неиммунных заболеваниях.

Обычно появление высоких титров специфических аутоантител у клинически здоровых лиц может рассматриваться в качестве фактора риска развития аутоиммунного заболевания. Аутоантитела в сыворотке крови могут обнаруживаться за несколько месяцев до клинических проявлений заболевания. Так при ревматоидном артрите антицитруллиновые антитела могут быть обнаружены за полтора года до дебюта артрита, обнаружение антинейтрофильных антител предвещает развитие гломерулонефрита на несколько месяцев.

Клиническое значение обнаружения аутоантител отчасти зависит от титров содержания аутоантител в сыворотке обследуемого. Обычно высокое содержание антител указывает на высокую аффинность последних. Это, в свою очередь, характеризует специфичность и выраженность иммунного ответа. Обнаружение высоких титров антител обычно указывает на аутоиммунное заболевание, в то время как низкие титры часто отмечаются в норме и не специфичны. В отсутствии иммуносупрессивного лечения при аутоиммунных заболеваниях содержание аутоантител обычно сохраняется высоким длительное время. В случае появления антител на фоне инфекции или неиммунного воспаления титры антител обычно нестойки и подвержены значительным колебаниям. Аутоантитела могут быть индуцированы воспалительным, инфекционным, онкологическим процессом или спровоцированы назначением определенных препаратов. Для того, чтобы отличить транзиторную индукцию аутоантител от хронического присутствия аутоантител при аутоиммунном заболевании, может потребоваться повторное обследование. Учитывая, что время полужизни сывороточных иммуноглобулинов составляет около 3 недели, минимальное время между повторными обследованиями должно превышать 1-3 месяца.

В то же время, продукция аутоантител при аутоиммунных заболеваниях не является постоянной величиной. Встречаемость аутоантител может нарастать с увеличением длительности аутоиммунного заболевания, как это происходит при ревматоидном артрите, или снижаться ниже порога детекции в течение первого года заболевания при сахарном диабете. Аутоантитела синтезируются в составе нормального пула иммуноглобулинов сыворотки крови **плазматическими** костного мозга, лимфатических узлов и селезенки, однако в ходе иммунного ответа при аутоиммунном процессе продукция антител в очаге воспаления может приобретать особые характеристики, например, может измениться **клональность** иммуноглобулинов. Так при рассеянном склерозе отмечается выраженное увеличение местного синтеза антител и иммунный ответ в ликворе становится **олигоклональным**, а при смешанной **криоглобулинемии** в состав криоглобулинов сыворотки входит **моноклональный** ревматоидный фактор.

Хотя большинство аутоантител являются свидетелями аутоиммунного воспаления, и их содержание не коррелирует с активностью заболевания, обнаружение определенных типов аутоантител при ревматических заболеваниях указывает на характерные особенности клинического течения. Так у пациентов, имеющих в сыворотке специфический набор антител, наблюдается особенное течение заболевания, отличное от симптоматики больных, не имеющих этих антител. При СКВ сопровождающейся антителами к Ro/SS-A, гломерулонефрит встречается реже, чем у больных, имеющих высокий титр антител к дсДНК, но имеется определенный риск развития поражений кожи и склонность к повышенной фоточувствительности. Поэтому определение АНА позволяет врачу предсказать, а иногда и предотвратить развитие осложнений. Динамика титра определенных видов антител в ходе заболевания имеет прогностическое значение. Увеличение концентрации антител к дсДНК предшествует вспышке СКВ, и ранняя патогенетическая терапия может уберечь больного от развития клинических проявлений или уменьшить их остроту, что улучшает прогноз при этом заболевании.

Выделение больных с тем или иным типом аутоантител в отдельную, часто клинически гомогенную, группу подтверждается обнаружением определенного HLA генотипа у больных с конкретным типом АНА. Так, например, пациенты с дерматомиозитом, у которых в сыворотке крови обнаруживаются антитела к Jo-1, характеризуются исключительно HLA-DR3 (DRw17) и HLA-DRw52 генотипом. Таким образом, исследование содержания аутоантител и их спектра указывают на особенности функционирования иммунной системы и отражают ее особую предрасположенность к формированию аутоиммунных ответов.

Благодаря единому патогенетическому механизму индукции аутоантител, конкретные разновидности аутоантител могут быть сгруппированы в семейства, реагирующие с мишенями одного рода. Например, все представители семейства антинуклеарных антител реагируют с рибонуклеопротеиновыми антигенами ядер; аутоантитела, относящиеся к семейству антинейтрофильных цитоплазматических антител, реагируют с набором антигенов, локализованных в азурофильных гранулах цитоплазмы нейтрофилов. Каждая разновидность аутоантител, даже направленная к одному антигену, представляет собой поликлональную популяцию антител, представленную молекулами иммуноглобулинов с разными физико-химическими свойствами. Это обусловлено тем, что поликлональные антитела реагируют с разными эпитопами на поверхности молекулы-антигена, причем сила связи каждой молекулы антитела с антигеном (аффинность) различна. Естественно, что в идеале иммунологический лабораторный метод должен выявлять не одну разновидность молекул, как это происходит в большинстве традиционных лабораторных тестов, а целый спектр аутоантител, направленных на разные антигены, причем каждое антител значительно отличается от других по заряду, молекулярной массе и силе связывания с антигеном, которая зависит от условий реакции. Такого идеального метода не существует.

На практике для точного описания спектра аутоантител, присутствующих в биологической жидкости, используется несколько методов, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки. В результате интерпретация результатов исследования одного лабораторный показателя зависит от метода, с помощью он определен.

Особенности обнаружения аутоантител приводят к тому, что один тест может иметь до 10 вариантов ответов включающих наличие аутоантитела, его титр, а также несколько разнообразных типов связывания антител с субстратом. Обычно на первом этапе тестирования используется метод, обладающий максимальной чувствительностью, в котором присутствует максимально широкий спектр антигенов. Уточнение

специфичности обнаруженных аутоантител возможно при использовании подтверждающих тестов, назначенных по результатам первичного тестирования.

Еще одной особенностью практического выявления аутоантител, вытекающей из биологической природы этого феномена, является то, что не существует абсолютно корректного подхода к измерению содержания аутоантител. Дело в том, что большинство иммунологических тестов построены на связывании аутоантитела и антигена-мишени. Результат теста зависит как от физической концентрации аутоантител, так и аффинности аутоантитела и антигена. При аутоиммунных заболеваниях, специфические антитела синтезируются в высокой концентрации и, обычно, обладают большой аффинностью. Однако, большая концентрация низкоаффинных аутоантител может дать сигнал более сильный, чем малая концентрация высокоаффинных специфических аутоантител. Так у больных с СКВ, у которых в результате поликлональной активации В-клеток, синтезируется большое количество полиспецифичных антител, наблюдаются ложно-положительные реакции в серологических тестах для обнаружения антител к вирусу гепатита С. В то же время, при волчаночном нефрите с нефротическим синдромом, в результате неселективной протеинурии утрачивается сывороточный IgG. В результате при низком содержании IgG тесты по выявлению аутоантител могут быть ложно-отрицательны. Низкоаффинные антитела, как было указано выше, нередко приводят к ложно-положительным результатам анализов. Обнаружение неспецифического и перекрестного связывания аутоантител в некоторых иммунологических тестах, обнаружение низких титров аутоантител в норме нередко требует выделения «серой зоны» или «зоны сомнительных результатов».

В случае обнаружения невысоких титров аутоантител, которые могут быть обусловлены неспецифическим связыванием аутоантител или присутствием специфических серологических маркеров, но в низкой концентрации, интерпретация результата зависит от постановки клинической задачи. Если речь идет об исключении ревматической природы заболевания в дифференциальной диагностике неревматической патологии, то результат может быть интерпретирован как отрицательный. В случае, если тест используется для подтверждения ревматического заболевания у больного с другими клиническими признаками ревматической патологии, результат теста должен рассматриваться как положительный.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Клетки-участники фагоцитарного процесса.
2. Этапы фагоцитоза.
3. Объекты фагоцитоза.
4. Исход фагоцитоза.
5. Физиологическая роль фагоцитоза

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 26

Цитокины в лабораторной диагностике

Интерлейкины — группа цитокинов, синтезируемая в основном лейкоцитами (по этой причине был выбран корень «лейкин»). Также производятся мононуклеарными фагоцитами и другими тканевыми клетками. Интерлейкины являются частью иммунной системы

Ход работы: В зависимости от количества определяемых образцов подготовить соответствующее количество реагентов, которые перед проведением анализа должны

быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры. В таблице 1 приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Количество используемых стрипов, шт	Буфер А, мл	Раствор антител, мл	Конъюгат, мл	Буфер Р, мл	Субстратная смесь	
					Раствор ТМБ, мл	Буфер С, мл
2	2	2	2	50	0,4	2
3	3	3	3	75	0,6	3
4	4	4	4	100	0,8	4
5	5	5	5	125	1,0	5
6	6	6	6	150	1,2	6
7	7	7	7	175	1,4	7
6	6	6	6	200	1,6	8
9	9	9	9	225	1,8	9
10	10	10	10	250	2,0	10
11,12	12	12	12	300	2,0	10

Внести во все лунки по 0,1 мл “Буфер А”

Внести в соответствующие лунки по 0,1 мл калибровочных проб или исследуемой сыворотки в дубликатах, внесение образцов не должно занимать более 15 мин.

Инкубировать стрипы при температуре 37°C в течение 2 часов со встряхиванием.

По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки три раза. При каждой промывке во все лунки добавить по 0,25 мл промывочного буфера, приготовленного по п.5.3, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5-10 сек с последующим декантированием. При каждом декантировании тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Внести во все лунки по 0,1 мл раствора антител, приготовленного по п.5.5. Инкубировать стрипы при температуре 37°C в течение 1 часа со встряхиванием. По окончании инкубации лунки промыть (см. пункт 6.5) Внести во все лунки по 0,1 мл раствора конъюгата Е, приготовленного по п.5.6. Инкубировать стрипы при температуре 37°C в течение 30 минут со встряхиванием

По окончании инкубации лунки промыть (см. пункт 6.5)

Перед окраской стрипы желательно сполоснуть дистиллированной водой для более полного удаления не связавшего конъюгата. За 5 минут до окончания инкубации приготовить необходимое количество субстратной смеси (см. Табл.1): в стакан, содержащий субстратный буфер из флакона с маркировкой “Буфер С”, внести необходимый объем раствора тетраметилбензидина из флакона с маркировкой “ТМБ”. Тщательно перемешать и поставить в темное место до использования. **ВНИМАНИЕ!!!**

Чисто вымытый стакан для приготовления субстратной смеси непосредственно перед использованием несколько раз ополоснуть дистиллированной водой. Для отбора необходимых объемов субстратного буфера и раствора ТМБ использовать только новые наконечники. Внести во все лунки по 0,1 мл субстратной смеси и инкубировать стрипы в темноте в течение 15-20 мин в зависимости от степени развития окраски. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и субстратную смесь, по 0,05 мл “Стоп-реагента” для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере 5мин. Измерить оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм. Рассчитать для каждой калибровочной или исследуемой пробы величину $V-V_0$, где V - среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы, V_0 - среднее значение оптической плотности в

лунках, содержащих калибровочную пробу “0 пг\мл” В линейных координатах на масштабной бумаге построить для калибровочных проб график зависимости оптической плотности в единицах оптической плотности (ОП) от концентрации IL-6 в пг\мл.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Клетки-продуценты цитокинов
2. Цитокины и их антагонисты
3. Клетки-мишени
4. Оценка клеток-продуцентов
5. Оценка цитокинов и их антагонистов в биологических средах организма

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 27.

Бактериологические исследования

Цель работы: освоение навыков посева биоматериала на питательную среду

Культивирование. Подавляющее число стафилококков — факультативные анаэробы. Подвид *S. aureus anaerobicus* в аэробных условиях не растет. С другой стороны, не растут на средах с тиогликолатом *S. arlettae*, *S. equorum*, не растет или слабо растет *S. lentus*. Температурный оптимум — 35-37° С, рН 7,2-7,4. Испытуемый материал обычно высевает на кровяной (овечий) агар, контаминированный — на молочно-солевой агар, среду Baird-Parker, плотные среды с добавлением на литр среды 15 мг налидиксовой кислоты и 10 мг колистина сульфата, желточно-солевой агар Чистовича и др. Посевы, за исключением случаев выделения анаэробного подвида *S. aureus*, инкубируют в аэробных условиях при 37° С в течение 24-48 часов.

Характер роста стафилококков на питательных средах. Приводим культуральные характеристики основных патогенных видов стафилококков и *S. saprophyticus*. Макроскопически видимые колонии образуются в течение 24 часов инкубирования.

S. aureus на плотных питательных средах формирует круглые, выпуклые, с гладкой, блестящей поверхностью непрозрачные колонии диаметром до 6-7 мм. Может образовывать α - или β -гемолизин. Колонии капсулообразующих штаммов более мелкие. Цвет колоний серый, серо-белый с желто-оранжевым или оранжевым оттенком. Штаммы, выделенные от собак, обычно не пигментированы. Пигментообразование наиболее выражено на средах, содержащих кровь, сыворотку крови, молоко, углеводы. В жидких питательных средах растет с равномерным помутнением, образованием плотного, легко суспендируемого осадка.

S. hyicus и *S. intermedius* на агаровых средах растут в виде круглых выпуклых, блестящих, непрозрачных колоний, достигающих на селективных средах диаметра 4-7 мм, пигмента не образуют.

S. gallinarum на плотных средах формирует непрозрачные, сухие, плоские, с дольчатыми краями колонии диаметром до 10-15 мм, желтые или непигментированные. Некоторые штаммы на кровяном агаре дают слабый гемолиз.

S. caprae растет на агаровых средах в виде круглых, слабовыпуклых, непрозрачных, с блестящей поверхностью непигментированных колоний. На кровяном агаре замедленно, через 48 часов и более, образует узкую зону β -гемолиза с широкой зоной частичного обесцвечивания среды.

S. epidermidis на плотных средах образует круглые, с гладкой, блестящей поверхностью, непрозрачные колонии диаметром 3-6 мм серого или серо-белого цвета. При длительном культивировании липкость колоний возрастает и в центре формируется углубление. Некоторые штаммы образуют небольшое количество гемолизина. При росте в питательном бульоне формируется слизистый осадок.

S. saprophyticus растет на агаровых средах в виде круглых, выпуклых, с гладкой, блестящей поверхностью колоний диаметром до 5-9 мм. Некоторые штаммы образуют желтый или желто-оранжевый пигмент.

Ход работы

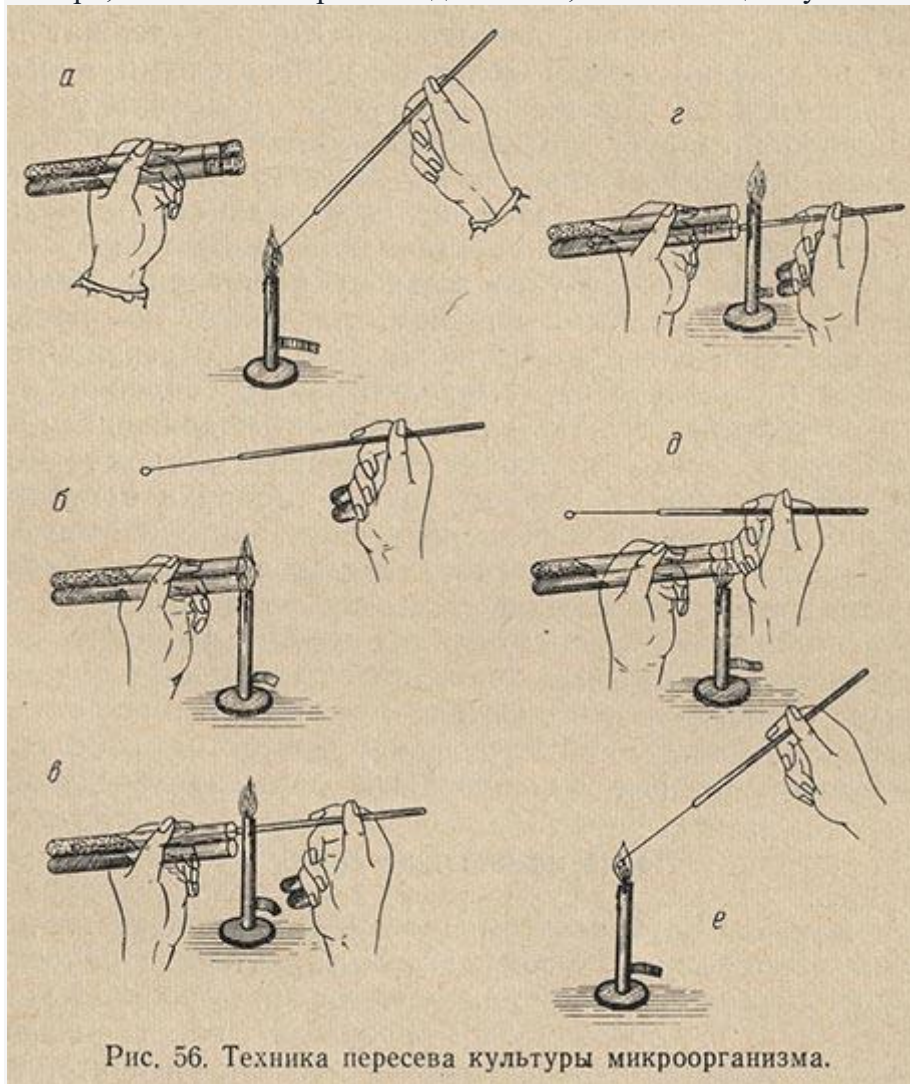
Посев петлей (иглой). Прокаленной петлей или иглой, которую держат в руке между указательным, средним и большим пальцами (подобно карандашу или ручке), захватывают небольшое количество налета с поверхности сырья или каплю посевного материала из исследуемой жидкости, слегка погрузив в нее петлю. В левой руке держат пробирку (или колбочку) с питательной средой. На пламени горелки обжигают верхнюю часть пробирки (колбы) непосредственно у пробки. При этом сосуд со средой слегка наклоняют, но так, чтобы жидкость не выливалась и не смачивала пробки и краев посуды. Мизинцем и безымянным пальцем правой руки вынимают пробку из пробирки и зажимают ее до конца посева между этими пальцами и ладонью так, чтобы входящая в пробирку часть пробки не прикасалась к руке. Все манипуляции производят над пламенем горелки. В открытую и наклоненную пробирку вводят петлю с посевным материалом, слегка погружая петельку в среду и размазывая внесенный материал по стенке пробирки, осторожно размещивают петлей питательную среду. Закончив посев, не изменяя наклонного положения пробирки, закрывают ее ватной пробкой, обжигая в пламени горелки конец пробирки и ту часть ватной пробки, которая входит в пробирку. Лишь после этого возвращают пробирку в вертикальное положение. По окончании посева петлю немедленно стерилизуют в пламени горелки.

Техника посева петлей бактериологического материала из одной пробирки в другую почти аналогична. Обе пробирки - с культурой и стерильной питательной средой - держат в наклонном положении между большим и остальными пальцами левой руки (рис. 56, положение а). При этом пробирку с культурой микробов следует держать ближе к себе. Вся работа, как и в первом случае, выполняется под защитой пламени горелки, а наклонное положение пробирок предохраняет питательную среду от оседания в нее микроорганизмов из воздуха.

Петлю держат между указательным и большим пальцами правой руки, а свободными пальцами извлекают из пробирок пробки, предварительно внеся их на несколько секунд в пламя горелки (положение б). Извлекать ватные пробки нужно плавно, не рывком, а легким винтообразным движением.

Прокалив на огне петлю и подвергнув легкому обжигу верхние концы пробирок, вводят внутрь пробирки с культурой петлю, забирают петлей ничтожную часть бактериального материала (положение в) и переносят его во вторую пробирку со стерильной средой

(положение г). Когда посев закончен, края пробирок и нижние концы ватных пробок проводят сквозь пламя горелки и легким движением закрывают пробирки пробками (положение д). Петля стерилизуется и откладывается (положение е). Работать нужно быстро, но избегая резких движений, вызывающих усиленное движение воздуха.



КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Основной метод микробиологической диагностики кишечных инфекций, вызываемых кишечной палочкой
2. Возбудители бактериальной дизентерии
3. *Основной метод микробиологической диагностики бактериальной дизентерии*
4. *Отличительные особенности иерсиний от других энтеробактерий*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 28. Вирусологические исследования

Цель работы: определение антител к вирусу методом ИФА

Вирусологические исследования включают два основных этапа: выделение вирусов и их идентификацию. Материалами могут быть кровь, другие биологические и патологические жидкости, биоптаты органов и тканей.

Вирусологическое исследование крови часто проводят с целью диагностики арбовирусных инфекций. В слюне могут быть обнаружены вирусы бешенства, эпидемического паротита, простого герпеса. Носоглоточные смывы служат для выделения возбудителей гриппа и других ОРВИ, кори. В смывах с конъюнктивы обнаруживают аденовирусы. Из фекалий выделяют различные энтеро-, адено-, рео- и ротавирусы.

Для выделения вирусов используют культуры клеток, куриные эмбрионы, иногда лабораторных животных. Большинство патогенных вирусов отличается наличием тканевой и типовой специфичности, например, полиовирус репродуцируется только в клетках приматов, поэтому для выделения определенного вируса используют соответствующую культуру ткани. Для выделения неизвестного возбудителя целесообразно одномоментно заражать 3—4 культуры клеток, предполагая, что одна из них может оказаться чувствительной. Наличие вируса в зараженных культурах определяют по развитию специфической дегенерации клеток, т.е. цитопатогенному действию, обнаружению внутриклеточных включений, а также на основе выявления специфического антигена методом иммунофлюоресценции, положительных реакций гемадсорбции и гемагглютинации. Эмбрионы птиц с их малодифференцированными тканями пригодны для культивирования очень многих вирусов. Чаще всего используют эмбрионы кур. При размножении в эмбрионах вирусы могут вызвать их гибель (арбовирусы), появление изменений на хорион-аллантоисной оболочке (оспешные вирусы) или в теле эмбриона, накопление в эмбриональных жидкостях гемагглютининов (вирусы гриппа, паротита) и комплементсвязывающего вирусного антигена.

Анализ. На сегодняшний день для лабораторной диагностики наиболее часто используется иммуноферментный анализ (ИФА) на антитела к вирусу. С помощью данного исследования представляется возможным диагностика острых форм эпидемического заболевания а также оценка состояния иммунитета после прививки или перенесенного ранее заболевания.

Выньте планшет из упаковки и оставьте в каретке необходимое количество стрипов. Остальные стрипы поместите обратно в пакет и храните в соответствии с условиями

Порядок внесения исследуемых и контрольных образцов сывороток

В лунки A1 и B1 внесите по 100 мкл K-

в лунки C1 и D1 - по 100 мкл K+ в лунку E1 внесите 100 мкл раствора № 2 (контроль конъюгата). В оставшиеся свободными лунки внесите по 90 мкл раствора № 2 и по 10 мкл сывороток в разведении 1:10.

При проведении диагностических исследований в лунки планшета внесите по

100 мкл всех полученных разведений парных сывороток, начиная с разведения 1:100.

Планшет заклейте пленкой (или закройте крышкой) и выдержите в течение

(60±2) мин при температуре (37±1) °C.

Промывание

Удалите жидкость из лунок с помощью аппарата для промывания планшетов.

Промойте планшет пятикратно раствором № 1 (см. п. 6.1), внося в лунки по 250мкл промывающего раствора и выдерживая раствор в лунках не менее 20 с. После промывания тщательно удалите влагу из планшета, постукивая им по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

ВНИМАНИЕ! Недостаточное промывание планшетов может привести к получению ложных результатов.

Во все лунки планшета внесите по 100 мкл конъюгата. Планшет заклейте пленкой (или закройте крышкой) и выдержите в течение (60±2) мин при температуре (37±1) °C.

Промывание

Повторите процедуры, описанные

. Во все лунки планшета внесите по 100 мкл раствора субстрата

Планшет поместите в защищенное от света место на (15±2) мин при температуре от 18 до 25°C.

Не располагайте планшеты стопкой!

Остановите пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 50 мкл стоп-реагента и не позднее, чем через 10 мин, проведите учет результатов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Методы обнаружения вирусов на тканевых культурах
2. Вакцина против гепатита В представляет собой
3. *Какой вирусный гепатит чаще сопровождается хронизацией патологического процесса с исходом в цирроз*
4. *Основной путь передачи при энтеровирусной инфекции*

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 29.

Лабораторная диагностика кожных и венерических заболеваний

Цель работы: определение антигенов методом ПИФ

Метод прямой иммунофлюоресценции представляет собой способ непосредственного выявления антигенов хламидий. Люминесцентная микроскопия определяет хламидийные включения как образования в клетках эпителия с желто-зеленой, либо зеленой флюоресценцией на фоне коричнево-оранжевой цитоплазмы клеток. Включения имеют гомогенную, зернистую, либо смешанную структуру.

Прямая иммунофлюоресценция применяется в случаях: острой фазы заболевания; хронической фазы заболевания; установления этиологии инфекционных хронических процессов урогенитального тракта; беременности, отягощенной акушерским анамнезом; бесплодия неопределенного генеза.

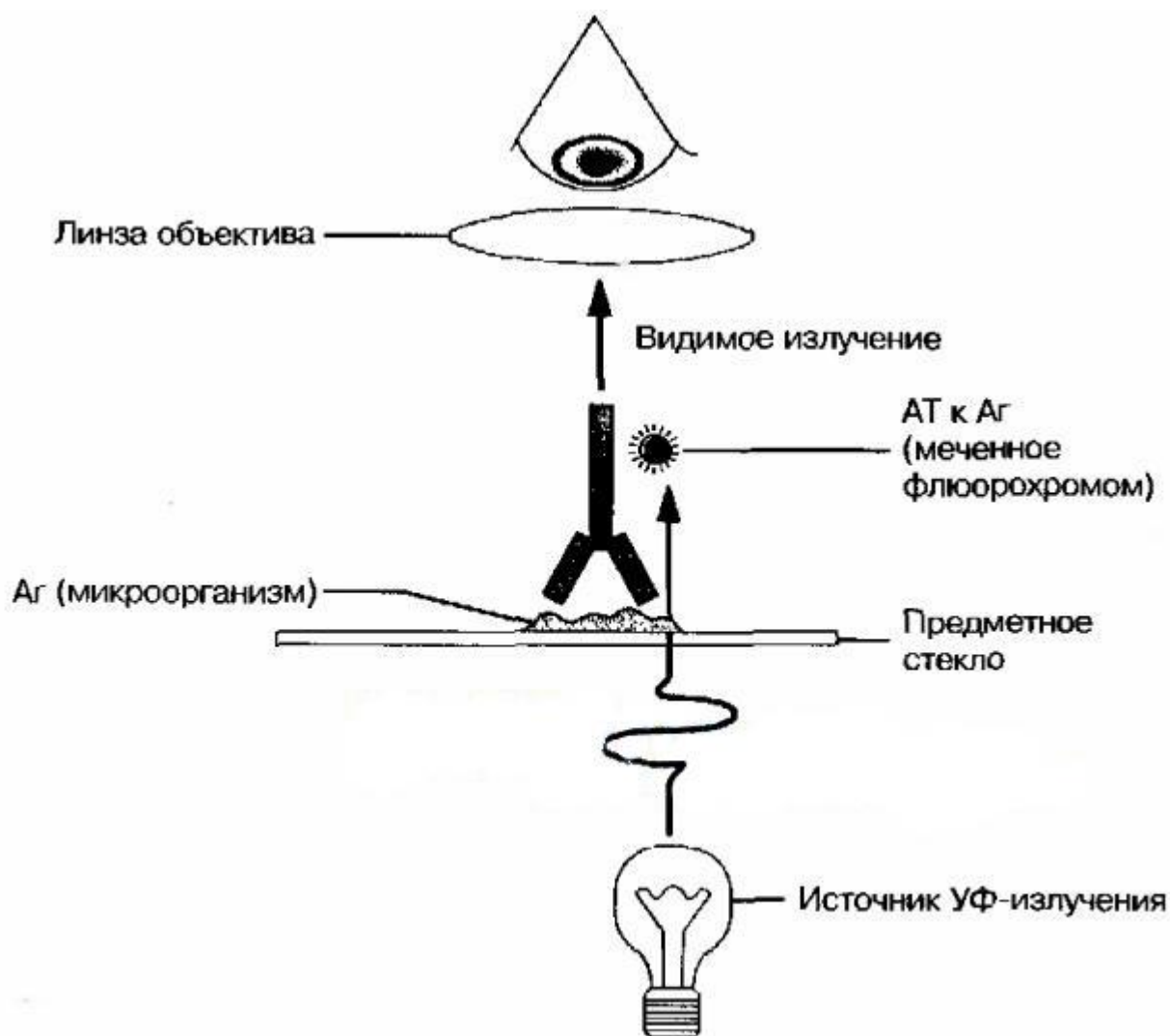


Рис. 1. Прямая иммунофлюоресценция. Прямой метод предполагает использование помеченных флюоресцирующим красителем АТ к интересующему Аг; АТ взаимодействуют с Аг в местах их локализации, что и позволяет визуализировать метка.

Информативная способность прямой иммунофлюоресценции заключается в выявлении не только корпускулярных, но и растворимых антигенов хламидий. Данный метод работает вне зависимости от вероятных изменений тинкториальных особенностей микроорганизмов при заболевании и при лечении. Метод прямой иммунофлюоресценции является основным скрининговым методом диагностирования урогенитального хламидиоза. Его специфичность и чувствительность составляет 65-90% или 85-90% в случаях применения моноклональных антител. Оценивая результаты, следует иметь в виду, что в качестве положительных итогов теста оценивается исключительно показатель флюоресценции внутриклеточных включений, если использовались поликлональные антихламидийные антитела.

В случае использования моноклональных антител результаты считаются положительными, если в поле зрения присутствуют 10 ЭТ (элементарных телец), либо хотя бы одно внутриклеточное включение. Подготовка соскобных препаратов такая же, как и при цитоскопических исследованиях. Моноклональные антитела можно отличить одно от другого по неизменности обнаруживаемых форм ЭТ, яркости флюоресценции и уровню специфичности. При диагностировании описанным методом хламидий используют люминесцентный микроскоп.

Специалисты сходятся во мнении, что метод прямой иммунофлюоресценции отвечает требованиям высокой специфичности и чувствительности, однако при этом серьезно возрастают критерии компетенции лабораторных работников. Достаточно высокий уровень экспертной оценки методом прямой иммунофлюоресценции доступным бывает далеко не всегда, отчего усредненный показатель его чувствительности недостаточно высок. В случаях определения малого количества ЭТ метод не гарантирует необходимой чувствительности, что приводит иногда к ложноотрицательным результатам.

К непрямому методу иммунофлюоресценции прибегают в случаях, когда отсутствует ФИТЦ-конъюгат антихламидийных антител. В таких ситуациях подготовленный из клинических проб тем же способом, что и для прямой иммунофлюоресценции, препарат сначала обрабатывают антихламидийными антителами, которые получают методом иммунизации хламидиями кроликов, мышей, овец, либо других животных а потом – специфичной для данного, иммунизированного хламидиями, животного второй сывороткой. Антитела последней сыворотки являются конъюгированными с ФИТЦ. Специфичность и показания к использованию описанного метода сопоставимы с методом прямой иммунофлюоресценции.

Говоря о методах иммуноферментного анализа, следует отметить, что основаны они на выявлении растворимого антигена хламидии в предоставленных на исследование пробах. В клинической практике используются, преимущественно, наборы реагентов, образованные методом твердофазных ИФА-анализов для установления антигенов хламидий. Амплификации достигают, используя методы полимерной конъюгации, следствием чего является фиксация, когда для каждого связанного участка антигена определяется полимерная группа с высокомолекулярной составляющей.

Вследствие применения метода фермент-амплификации положительная проба приобретает желто-оранжевую окраску, интенсивность которой пропорциональна численности антигена хламидии. Точные результаты исследования определяются при помощи вычислительной техники.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие методы диагностики вы знаете
2. Наиболее характерным серологическим показателем для герпеса беременных является
3. Инфекции ВИЧ не передаются
4. При глубокой трихофитии в волосах обнаруживаются следующие изменения

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 30.

Лабораторная диагностика паразитарных болезней

Цель работы: освоение микробиологических исследований кала на яйца и личинки гельминтов, простейшие и их цисты методом формалин-эфирной седиментации.

Оборудование:

- Пробирка с пробкой-фильтром со шпателем (двухступенчатый фильтр) – 40 шт.,
- Пробирка с раствором формалина (2,4 мл 10%-го забуференного формалина и 0,05 мл Тритона Х-100) – 40 шт.,
- Флакон с этилацетатом (40 мл) – 1 шт.

Ход работы:

1. Внести в камеру смешения (цилиндрическую пробирку с раствором формалина) 0,9

мл этилацетата, затем с помощью шпателя (с пробкой-фильтром) образец кала размером с горошину (около 0,5 г). Перемешать и закрыть пробкой-фильтром (с присоединённым коническим сборником). Внимательно проверить плотность соединения частей конструкции: обе части должны плотно прилегать к пояску на фильтре.

2. Встряхнуть до получения однородной суспензии на вортексе. При отсутствии вортекса можно на несколько часов оставить до момента ручного встряхивания.

3. Центрифугировать при 1200g (около 3000 об/мин в зависимости от ротора центрифуги) 3 минуты в положении конической частью вниз. Держа конструкцию в вертикальном положении, снять пробку-фильтр вместе с цилиндрической пробиркой.

4. В коническом сборнике (конической пробирке) образуется 3 слоя. Верхний - жировая пробка (в исключительных случаях не образуется), далее водный слой консерванта и осадок на дне. Микроскопировать следует осадок со дна конического сборника.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Методы сбора, группировки и статистической обработки информации об эпидемической ситуации по паразитарным болезням
2. Методика эпидемиологического расследования случаев паразитарных заболеваний.
3. Оценка показателей заболеваемости и санитарно-паразитологического благополучия детских и подростковых коллективов.
4. *Оценка эффективности и качества профилактических и противоэпидемических мероприятий.*
5. *Организация и проведение сбора информации с применением лабораторных методов исследования.*

Рекомендуемая литература и интернет-ресурсы

Основная литература

1. Анализы крови и мочи в клинической диагностике / А. С. Марина, Ю. В. Наточин. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2022. — 159 с.
2. Гематология: руководство для врачей / под. Ред. Н.Н. Мамаева. — 3-е изд., доп. И испр. — СПб.: СпецЛит, 2021. — 639с.
3. Кровь и лимфа. Кроветворение : учебное пособие / Л. Р. Мутушвили, О. Б. Жданова, И. И. Окулова [и др.]. — Киров : Кировский ГМУ, 2021. — 121 с.
4. Клиническая лабораторная диагностика : учебное пособие / А. А. Кишкун. - 2-е изд., перераб. и доп. - М. :
5. Клиническая лабораторная диагностика. Учебник / А.А. Кишкун, Л.А. Беганская — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2023. — 523с.
6. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. — Москва-Тверь: Изд-во «Триада», 2021. — 434с.

8.1.2. Перечень дополнительной литературы:

1. Медицинская аппаратура. Полный справочник [Электронный ресурс] / М. Ю. Ишманов, С. А. Попов, С. А. Попович [и др.]. — Электрон. текстовые данные. — Саратов: Научная книга, 2019. — 399 с. 978-5-9758-1838-6. —
2. Лабораторные исследования в клинической биохимии. Методические рекомендации для специалистов по клинической лабораторной диагностике. — Ст. 2023. - 129 с.
3. Миронова И.И., Романова Л.А., Долгов В.В. Общеклинические исследования: моча, кал, ликвор, эякулят. М. — Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2022. — 206 с.
4. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / Под ред. Проф. М.А. Базарновой, 2020. — 318 с
5. www.clinlab.info — сайт для врачей клинической лабораторной диагностики
6. www.ramld.ru — Российская Ассоциация медицинской лабораторной диагностики

7. www.rosminzdrav.ru – Министерство здравоохранения Российской Федерации