Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

А.А. Садыкова, Е.А. Степовая,
Е.В. Шахристова, О.Л. Носарева, Д.А. Дьяков

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ

для студентов медико-биологического факультета

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

В 2-х частях. Часть 1

Томск
Издательство СибГМУ
2020

УДК 577
ББК 28-072
Л 125

Авторы
Садыкова А.А., Степовая Е.А., Шахристова Е.В., Носарева О.Л., Дьяков Д.А.

Лабораторный практикум по биохимии для студентов медико-биологического факультета. В 2-х частях. Часть 1: учебное пособие / А.А. Садыкова [и др.]. – Томск: Издательство СибГМУ, 2020. – 139 с.

Л 125

Учебное пособие написано по дисциплинам «Биохимия», «Клиническая лабораторная диагностика» в соответствии с требованиями Федерального государственного образовательного стандарта высшего профессионального образования для студентов, обучающихся по основным профессионально-образовательным программам – программе специалитета: «Медицинская биохимия».

Материал пособия способствует формированию профессиональных компетенций: проведению и оценке результатов лабораторных исследований в целях распознавания состояния или установления факта наличия или отсутствия заболевания.

Каждая тема раздела в учебном пособии разделена на теоретический и экспериментальный блоки. В теоретическом блоке представлено обоснование, практическое применение химико-микроскопических, биохимических, иммунологических методов в медицине. Экспериментальный блок состоит из лабораторных работ, выполняемых студентами на практических занятиях.

По каждой теме разделов студентам предлагаются вопросы для самостоятельной подготовки к практическим и семинарскому занятиям, контрольные вопросы, тестовые задания, ситуационные задачи для проверки полученных знаний.

Пособие предназначено для контроля знаний и самостоятельной подготовки к практическим занятиям по биохимии, клинической лабораторной диагностике студентов медико-биологического факультета, для дополнительного контроля полученных знаний по биохимии студентов врачебных факультетов, а также для подготовки к процедуре первичной аккредитации специалистов по специальности «Медицинская биохимия» (уровень специалитета).

УДК 577
ББК 28-072

Рецензент:
Кузьменко Д.И. – д-р мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики *ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России*.

Учебное пособие утверждено и рекомендовано к печати Учебно-методической комиссией МБФ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 2 от 22.05.2019 г.).

© Издательство СибГМУ, 2020
© А.А. Садыкова, Е.А. Степовая, Е.В. Шахристова, О.Л. Носарева, Д.А. Дьяков, 2020

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген
АЛТ – аланинаминотрансфераза
АТ – антитело
АТФ – аденозинтрифосфат
БСЖК – белок, связывающий жирные кислоты
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ИА – индекс атерогенности
ИМ – инфаркт миокарда
ИФА – иммуноферментный анализ
ИХА – иммунохроматографический анализ
КДЛ – клинико-диагностическая лаборатория
КЛД – клиническая лабораторная диагностика
КОС – кислотно-основное состояние
КФК – креатинфосфокиназа
ЛИС – лабораторная информационная система
ЛПВП – липопротеин высокой плотности
ЛПНП – липопротеин низкой плотности
ЛПОНП – липопротеин очень низкой плотности
МБТ – микобактерия туберкулеза
МВ-КФК – МВ-фракция креатинфосфокиназы
ОПН – острая почечная недостаточность
ПЖ – поджелудочная железа
СД – сахарный диабет
СМЖ – спинномозговая жидкость
СОЭ – скорость оседания эритроцитов
СРБ – С-реактивный белок
ТАГ – триацилглицерол
ХЛ – холестерол
ХМ – хиломикрон
ХПН – хроническая почечная недостаточность
ЦНС – центральная нервная система
ЭКГ – электрокардиограмма

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных задач врача любой специальности является медицинская диагностика – распознавание состояния или установление факта наличия или отсутствия заболевания. Диагностика основывается на всестороннем и систематическом обследовании больного, которое включает объективное исследование состояния организма. В современной практической медицине одно из ведущих мест в ряду объективных диагностических исследований занимает клиническая лабораторная диагностика.

Клиническая лабораторная диагностика – медицинская специальность, основной задачей которой является получение объективной, точной и своевременной информации о структурном и функциональном состояниях различных клеток, тканей, органов и систем организма.

В учебном пособии отражены современные алгоритмы и методы лабораторной диагностики различных органных патологий. Каждая тема раздела в учебном пособии разделена на теоретический и экспериментальный блоки. В информационном блоке представлено обоснование, практическое применение химико-микроскопических, биохимических, иммунологических методов в медицине. Экспериментальный блок состоит из лабораторных работ, выполняемых студентами на практических занятиях.

По каждому разделу и темам раздела студентам предлагаются вопросы для самостоятельной подготовки к практическим и семинарскому занятиям, контрольные вопросы, тестовые задания, ситуационные задачи для проверки полученных знаний.

Пособие предназначено для контроля знаний и самостоятельной подготовки к практическим занятиям по биохимии, клинической лабораторной диагностике студентов медико-биологического факультета, для дополнительного контроля полученных знаний по биохимии студентов врачебных факультетов, а также для подготовки к процедуре первичной аккредитации специалистов по специальности «Медицинская биохимия» (уровень специалитета).

Материал настоящего учебного пособия способствует формированию профессиональных компетенций: проведению и оценке результатов лабораторных исследований в целях распознавания состояния или установления факта наличия или отсутствия заболевания.

РАЗДЕЛ 1

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА: ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И МЕНЕДЖМЕНТ КАЧЕСТВА КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ТЕМА 1.1. КЛЮЧЕВЫЕ ПОНЯТИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ. ЛАБОРАТОРНАЯ АНАЛИТИКА. ОСНОВЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

Клиническая лабораторная диагностика (КЛД) – медицинская специальность, основной задачей которой является получение объективной, точной и своевременной информации о структурном и функциональном состояниях различных клеток, тканей, органов и систем организма.

В современной практической медицине КЛД занимает одно из ведущих мест в ряду объективных диагностических исследований. В клинической практике методы КЛД применяют для установления диагноза болезни, для характеристики тяжести, периода и срока заболевания, для определения его прогноза, а также для контроля лечения.

Любое лабораторное исследование представляет собой сложный процесс, состоящий из преаналитического (подготовка пациента, взятие биологического материала, его предварительная обработка, транспортировка и хранение), аналитического (процедуры проведения аналитической реакции, измерения, расчет результатов) и постаналитического (оформление бланка с результатами исследования, их лабораторно-клиническая интерпретация, доведение полученной информации до сведения врача) этапов.

Получение надежных результатов лабораторных исследований, достоверно отражающих состояние пациента, требует соответствующего качества их выполнения на всех этапах сложного процесса.

Основной формой контроля качества исследований является внутренний (внутрилабораторный) контроль. Порядок проведения внутри-

лабораторного контроля качества для каждой выполняемой в лаборатории количественной методики исследования состоит из трех последовательных стадий: стадия 1 – оценка повторяемости результатов измерений; стадия 2 – оценка прецизионности и относительного смещения по результатам установочной серии измерений, построение контрольных карт; стадия 3 – проведение оперативного внутрилабораторного контроля качества.

Систематическое выполнение процедур оперативного контроля качества позволяет выявлять погрешности и своевременно проводить работу по их устранению.

ЦЕЛЬ

Изучить основы организации и ключевые понятия клинической лабораторной диагностики.

Приобрести практические навыки по проведению внутреннего контроля качества количественных лабораторных исследований.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Клиническая лабораторная диагностика как медицинская специальность: цель, задачи, значение. Перечень специализаций в составе дисциплины.
2. Клиническая лабораторная диагностика в практической медицине: цель, задачи, значение и доля в комплексе диагностических обследований.
3. Нормативно-правовая основа организации лабораторной службы в России.
4. Структура и функции клинико-диагностической лаборатории: типы, задачи лаборатории, виды клинического материала для исследования, санитарно-гигиенические и противоэпидемические мероприятия, медицинские отходы.
5. Ключевые этапы выполнения лабораторных исследований: преаналитический, аналитический и постаналитический.
6. Технология составления заявки (направления) на лабораторные исследования.
7. Подготовка пациента к сдаче клинического материала для различных лабораторных исследований.
8. Процедура взятия крови: способы (техники), приспособления, осложнения, возможные затруднения, типичные ошибки.

9. Организация доставки образцов биологического материала в лабораторию: обеспечение безопасности при сборе и транспортировке, нормативы времени доставки, условия доставки, допустимое время хранения образцов различных видов клинического материала, основные критерии отказа в принятии лабораторией биоматериала на исследования.
10. Технология оценки результатов лабораторных исследований: единицы измерения, используемые в клинико-диагностических лабораториях; понятие нормальной и референтной величин.
11. Влияние физиологических факторов и окружающей среды на концентрацию веществ в крови (биологическая вариация): диета, положение тела, наложение жгута, циркадные ритмы, возраст (первый и второй перекресты в лейкоцитарной формуле), раса, беременность, физические упражнения, высота над уровнем моря, влияние различных веществ (кофеин, никотин, алкоголь), менструальный цикл и другие.
12. Изменение результатов лабораторных исследований под влиянием диагностических и лечебных мероприятий (ятрогенная вариация).
13. Использование результатов лабораторных исследований в лечебно-диагностическом процессе.
14. Понятие о контроле качества клинических лабораторных исследований. Виды контроля качества. Этапы контроля качества. Унификация и принципы стандартизации клинических лабораторных методов.
15. Теоретические основы контроля качества лабораторных исследований (термины и определения): точность измерений, погрешность измерений, систематическая погрешность измерения, правильность измерений, случайная погрешность измерения, воспроизводимость измерений, аналитическая серия, внутрисерийная, межсерийная и общая воспроизводимости, установленное значение, специфичность (селективность).
16. Источники погрешностей, выявляемые системой внутрилабораторного контроля качества: внутренние (лабораторные) и внешние (внелабораторные) факторы.
17. Относительная систематическая погрешность (смещение, сдвиг): алгоритм расчета.
18. Величина случайной погрешности: расчет среднеквадратического отклонения (S) и коэффициента вариации (CV).

19. Контрольные материалы: виды, требования, рекомендации по выбору, правила использования.
20. Порядок проведения внутрилабораторного контроля качества: стадия 1 (вводная): оценка внутрисерийной воспроизводимости методики; стадия 2 (вводная): оценка смещения и коэффициента общей аналитической вариации методики, построение контрольной карты; стадия 3 (основная): оперативный (текущий) внутрилабораторный контроль качества. «Контрольные» правила Вестгарда (Westgard).
21. Внешняя (межлабораторная) оценка качества лабораторных исследований: понятие, цели, системы.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Принципы медицинской этики и деонтологии в практической деятельности специалистов по клинической лабораторной диагностике.
2. Метрология в клинической лабораторной диагностике: цели и средства.
3. Автоматизированное ведение внутрилабораторного контроля качества с использованием компьютерных программ.
4. Использование лабораторных информационных систем (ЛИС) в современной клинико-диагностической лаборатории.

Лабораторная работа №1

ОЦЕНКА ПОВТОРЯЕМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ИЗМЕРЕНИЙ

Цель работы

Проверить соответствие повторяемости результатов измерения установленным нормам.

Исследуемый материал

Контрольный материал со значением аналита в нормальном диапазоне.

Ход работы

1. Провести 10 измерений определяемого показателя на одном и том же материале в условиях одной аналитической серии.

2. Рассчитать значение коэффициента вариации (*CV*), используя формулы (1), (2) и (3):
   – *среднеарифметическое значение* $\overline{X}$:

$$\overline{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}, \quad (1)$$

где x_i – результат i-го измерения из n выполненных; n – число измерений; $\sum_{i=1}^{n} x_i$ – сумма результатов измерений $x_1, x_2, \ldots, x_n$.

   – *среднеквадратическое отклонение S:*

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \overline{X})^2}{n-1}}, \quad (2)$$

где $\sum_{i=1}^{n} (x_i - \overline{X})^2$ – сумма квадратов отклонений результатов измерений $x_1, x_2, \ldots, x_n$ от среднеарифметического $\overline{X}$.

   – *коэффициент вариации CV:*

$$CV = \frac{S}{\overline{X}} \cdot 100\%, \quad (3)$$

3. Оценить соответствие полученного значения *CV* установленным нормам точности: максимальный *CV* сходимости должен быть в два раза меньше (или равен) установленного нормативными документами значения коэффициента вариации для 10 измерений, выполненных в 10 аналитических сериях – CV_{10} (см. Приложение 1).
4. Если это условие не выполняется, необходимо провести поиск и устранение источника(ов) случайных ошибок и повторить измерения. При соответствии повторяемости установленным нормам – перейти к следующей стадии внутрилабораторного контроля качества.

Лабораторная работа №2

ОЦЕНКА ПРЕЦИЗИОННОСТИ И ОТНОСИТЕЛЬНОГО СМЕЩЕНИЯ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ УСТАНОВОЧНОЙ СЕРИИ ИЗМЕРЕНИЙ, ПОСТРОЕНИЕ КОНТРОЛЬНЫХ КАРТ

Цель работы

Оценить соответствие значений коэффициента вариации и относительного смещения установленным нормам.

Исследуемый материал

Контрольные материалы с аттестованными значениями аналитов, контрольные материалы для текущего ежесерийного контроля.

Ход работы

1. Провести измерение показателя в 20 аналитических сериях: в каждой серии по одному измерению одновременно в двух контрольных материалах (получить установочные серии измерений).
2. Рассчитать значение коэффициента вариации CV_{20}, используя формулы (1), (2), (3), и сравнить его с предельно допустимым значением (см. Приложение 1).
3. Если полученное значение CV_{20} превышает допустимое, следует выявить источник(и) погрешностей и провести работу по их устранению. Затем следует повторить пункты 1 и 2.
4. Если значения коэффициента вариации CV_{20} не превышают установленных норм – рассчитать относительное смещение B_{20} по формуле (4):

$$B = \frac{\overline{X} - \text{АЗ}}{\text{АЗ}} \cdot 100\% \quad , (4)$$

где АЗ – аттестованное значение измеряемой величины,

и сравнить его с предельно допустимым значением B_{20} (см. Приложение 1).

5. Если полученное значение B_{20} превышает допустимое, следует установить причину(ы) отклонения и устранить их. Затем следует повторить пункт 4.
6. Если полученное значение B_{20} не превышает допустимое – сделать окончательный вывод о возможности использования рассматриваемой методики для целей лабораторной диагностики и перейти к построению контрольных карт.

7. Из полученных в установочной серии 20 результатов измерений определяемого показателя рассчитать среднеарифметическое значение $\bar{X}$, среднеквадратическое отклонение *S*, контрольные пределы: $\bar{X}\pm 1S$, $\bar{X}\pm 2S$ и $\bar{X}\pm 3S$.
8. Если в ряду результатов оказалось значение, выходящее за пределы $\pm 3S$, то его не учитывать; выполнить еще одну аналитическую серию, затем снова подсчитать значения $\bar{X}$ и *S*.
9. Построить контрольные карты для каждого лабораторного показателя и для каждого контрольного материала, предназначенного для оперативного контроля качества.

   Примечание: *контрольная карта, построенная по установочной серии измерений, представляет собой график, на оси абсцисс которого откладывается номер аналитической серии (или дата ее исследования), а на оси ординат – значения определяемого показателя в контрольном материале.* Через середину оси ординат провести линию, соответствующую среднеарифметическому значению $\bar{X}$, и параллельно этой линии отметить линии, соответствующие контрольным пределам $\bar{X}\pm 1S$, $\bar{X}\pm 2S$ и $\bar{X}\pm 3S$.

Лабораторная работа №3

ПРОВЕДЕНИЕ ОПЕРАТИВНОГО ВНУТРИЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Цель работы

Оценить приемлемость результатов исследования проб пациентов и подтвердить стабильность аналитической системы по результатам исследования контрольных материалов в каждой аналитической серии.

Исследуемый материал

Контрольные материалы промышленного производства со значениями аналита в нормальном и патологическом диапазонах.

Ход работы

В каждой аналитической серии провести однократное измерение показателя в каждом контрольном материале (число образцов пациентов в аналитической серии не ограничивается; образцы контроль-

ных материалов следует равномерно распределить среди анализируемых проб пациентов при отсутствии иных указаний изготовителей приборов и реагентов).

1. Нанести точки, соответствующие результатам контрольных измерений, на контрольные карты.
2. При отклонении результатов контрольных измерений за контрольные пределы – оценить приемлемость результатов проб пациентов в данной аналитической серии с помощью контрольных правил: проверить присутствие на обеих контрольных картах предупредительного контрольного правила 1_{2S}.
3. Если один из результатов анализа контрольных материалов выходит за пределы $\bar{X}\pm 2S$ – последовательно проверить наличие контрольных правил 1_{3S}, 2_{2S}, R_{4S}, 4_{1S}, $10_{\bar{X}}$. Аналитическая серия признается неудовлетворительной при наличии одного из них:
   1_{3S} – одно из контрольных измерений выходит за пределы $\bar{X}\pm 3S$;
   2_{2S} – два последних контрольных измерения превышают предел $\bar{X}\pm 2S$ или расположены ниже предела $\bar{X}-2S$;
   R_{4S} – два контрольных измерения в рассматриваемой аналитической серии расположены по разные стороны от коридора $\bar{X}\pm 2S$;
   4_{1S} – четыре последних контрольных измерения превышают $\bar{X}+1S$ или расположены ниже предела $\bar{X}-1S$;
   $10_{\bar{X}}$ – десять последних контрольных измерений располагаются по одну сторону от линии, соответствующей $\bar{X}$.
4. Если в дополнение к нарушению признака 1_{2S} обнаруживается хотя бы один из указанных признаков 1_{3S}, 2_{2S}, R_{4S}, 4_{1S}, $10_{\bar{X}}$, все результаты, полученные в данной аналитической серии, считать неприемлемыми. Проведение анализа приостановить, выявить и устранить причину(ы) возникновения погрешностей. Все пробы, проанализированные в этой серии, исследовать повторно.
5. Если ни один из признаков, перечисленных выше, не обнаруживается ни на одной контрольной карте, проведение исследований следует продолжить.

Оформление работ

Указать цели работ, ход работ и результаты проведения контроля качества, построить контрольные карты и сделать вывод о значении проведения внутреннего контроля качества количественных лабораторных исследований.

РАЗДЕЛ 2

ХИМИКО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ТЕМА 2.1. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЧИ

ВВЕДЕНИЕ

Моча – продукт обмена веществ, образующийся в почках в результате фильтрации жидкой части крови, а также процессов реабсорбции и секреции различных аналитов.

Состав мочи имеет важное диагностическое значение для постановки диагноза лечащим врачом и мониторинга состояния здоровья человека. Каждый показатель в составе мочи может являться индикатором конкретного заболевания, а любое отклонение значений от нормы – свидетельствовать о нарушении обменных процессов в организме.

Химико-микроскопический (клинический) анализ мочи – это комплексное исследование, в ходе которого оцениваются ее физико-химические характеристики и производится микроскопия мочевого осадка.

Клинический анализ мочи относится к рутинным лабораторным исследованиям, выполняется при профилактических обследованиях, а также в рамках комплексной диагностики заболеваний различного профиля, в частности, патологий мочевыделительной системы.

Комплекс методов химико-микроскопического анализа мочи традиционно включает: макроскопическую оценку (органолептический метод) клинического материала с описанием общих физических свойств, физические измерения биологической жидкости; химические исследования, которые проводятся с помощью диагностических тест-полосок (качественный и полуколичественный анализ): определение pH, уровня белка, глюкозы, кетоновых тел, билирубина, крови, нитритов, аскорбиновой кислоты и других показателей и/или химическими методами для подтверждения результатов определения параметров, полученных с помощью тест-полосок; визуальное исследование нативного препарата мочевого осадка с использованием микроскопа.

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмом, принципами и методиками химико-микроскопических исследований образцов мочи.

Приобретение практических навыков по оценке физико-химических свойств образцов мочи и микроскопическому исследованию нативных препаратов осадка мочи.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Понятие о химико-микроскопических (общеклинических) исследованиях биологического материала. Номенклатура клинических лабораторных исследований, применяемых в целях диагностики болезней и слежения за состоянием пациентов в учреждениях здравоохранения РФ.
2. Процесс образования и выведения мочи.
3. Подготовка пациента к сдаче мочи для лабораторных исследований.
4. Стандартизация и способы сбора мочи (сбор утреннего образца мочи, сбор случайного (разового, рандомизированного) образца мочи, сбор проб мочи за определенный промежуток времени, сбор суточной мочи, специальные методики сбора мочи (при помощи катетера)). Вакуумная система для сбора и транспортировки мочи.
5. Условия доставки образцов мочи в лабораторию. Критерии для отказа в приеме образцов мочи на исследование (приемлемость образцов мочи).
6. Консервация проб мочи. Виды консервантов. Допустимое время сохранения проб мочи для наиболее распространенных лабораторных исследований. Возможные изменения в моче при ее разложении в отсутствие консерванта.
7. Методология макроскопической оценки физических свойств мочи (оценка количества, цвета, прозрачности, запаха, относительной плотности). Факторы и причины, обусловливающие физические свойства мочи.
8. Возрастные нормы суточного диуреза. Изменение диуреза при патологических состояниях.
9. Технология определения химических свойств мочи с помощью тестовых полосок (pH, белка, глюкозы, кетоновых тел, билирубина, уробилиногена, нитритов, лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина, аскорбиновой кислоты): принцип, значение и ограничения метода. Правила использования реагентных полосок.

10. Подтверждение результатов, полученных с помощью тест-полосок, другими методами (определение относительной плотности мочи урометром; концентраций белка, глюкозы, билирубина и уробилиногена – химическими методами).
11. Понятие о физиологической и патологической протеинуриях. Степени протеинурии.
12. Методики получения осадка мочи и приготовления нативных, окрашенных препаратов для микроскопического исследования. Требования к образцу осадка мочи для микроскопического анализа. Условия микроскопического исследования нативного препарата осадка мочи.
13. Понятие о неорганизованном и организованном мочевых осадках. Микроскопические элементы организованного мочевого осадка. Микроскопические элементы неорганизованного мочевого осадка (кристаллические образования при щелочной, кислой реакциях мочи и независимо от pH мочи).
14. Дополнительные методы идентификации клеточных элементов в моче (суправитальная окраска препаратов осадка мочи, подсчет уролейкограммы). Условия микроскопического исследования окрашенного препарата осадка мочи.
15. Посторонние элементы в осадке мочи. Бактерии, гельминты (яйца гельминтов), патогенные простейшие в осадке мочи.
16. Референтные пределы и нормальные величины основных клинико-лабораторных параметров мочи.
17. Возможные источники ошибок исследования мочи и факторы, влияющие на результат анализа.
18. Клинико-диагностическое значение химико-микроскопического исследования мочи.
19. Процедуры контроля качества химико-микроскопического исследования мочи (внутри- и межлабораторный контроли качества).

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Мочевые станции и автоматические анализаторы мочи.
2. Неорганизованные осадки, редко встречающиеся в моче: кристаллы цистина, ксантина, лейцина, тирозина, гемосидерина, индиго, озазонов, сульфаниламидных препаратов, амидопирина и др.

Лабораторная работа №1

МАКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЧИ

Принцип исследования

Оценка физических параметров образцов мочи на основе анализа восприятий органов чувств.

Материал исследования

Модельные образцы мочи.

Проведение анализа

1. *Видимые посторонние примеси в моче.* Присутствие посторонних примесей определить с помощью осмотра образца мочи в чистой стеклянной пробирке в проходящем свете.
2. *Цвет мочи.* Пробирку с образцом осмотреть в проходящем свете на белом фоне.
3. *Запах мочи.* Определить органолептически.
4. *Прозрачность мочи.* Прозрачность мочи или степень ее мутности (прозрачная, мутноватая или мутная) определить с помощью осмотра образца биоматериала в чистой стеклянной пробирке в проходящем свете. Точная оценка прозрачности по шкале: «полная-неполная» предполагает чтение газетного шрифта через пробирку с мочой.

Нормальные показатели

Свежевыпущенная моча здорового человека прозрачная, соломенно-желтого цвета, имеет специфический нерезкий запах, не содержит видимых посторонних примесей.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели и результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №2

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МОЧИ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИИНДИКАТОРНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПОЛОСОК

Принцип исследования

В основе метода лежит эффект изменения окраски тестовой зоны диагностической полоски в результате реакции красителя, присутствующего в зоне индикации, с молекулами анализируемого вещества (pH, относительная плотность, глюкоза, белок, билирубин, уробилиноген, кетоновые тела, аскорбиновая кислота, лейкоциты, нитриты, кровь) мочи.

Используемые в тестировании реагенты и методики

Исследуемый параметр	*Принцип тестирования*
Билирубин	Тест основан на связывании билирубина с солями диазония (индикаторое поле диагностической полоски) в сильнокислой среде. Интенсивность желто-коричневого цвета тестового поля пропорционально концентрации билирубина в моче.
Уробилиноген	Тест основан на связывании уробилиногена со стабилизированными солями диазония (индикаторое поле диагностической полоски) в присутствии буфера. Интенсивность розово-красного цвета тестового поля пропорционально концентрации уробилиногена в моче.
Кетоновые тела	Ацетоуксусная кислота и ацетон реагируют с 2 % нитропруссидом натрия (индикаторое поле диагностической полоски) в щелочном буфере, давая фиолетовое окрашивание тестового поля (тест Легала), интенсивность которого пропорциональна концентрации кетоновых тел (ацетоуксусной кислоты) в моче.
Аскорбиновая кислота	Тест основан на обесцвечивании реагента Тиллмана (0,7 % 2,6-дихлорофенолиндофенол в индикаторном поле диагностической полоски). Присутствие аскорбиновой кислоты вызывает изменение окраски тестового поля от серо-голубого до оранжевого.
Глюкоза	Тест основан на двойной последовательной ферментной реакции. Индикаторная зона содержит 2,1 % глюкозооксидазу, 0,9 % пероксидазу, 5 % гидрохлорид толидина. Глюкозооксидаза катализирует образование глюконовой кислоты и перекиси водорода с окислением глюкозы. Пероксидаза катализирует реакцию перекиси водорода с иодидом калия с окислением хромогена от зеленого до голубого цветов.

Белок	В забуференном тестовом поле импрегнирован индикатор 0,2 % тетрабромфенол синий, который становится зеленым в присутствии белка (альбумина). Это изменение цвета основано на «протеиновом сдвиге» pH индикатора.
Кровь	Забуференное тестовое поле диагностической полоски содержит пероксидазу и хромоген (25 % изопропилбензол гидропероксид и 0,2 % тетраметилбензидина гидрохлорид). Пероксидазная активность гемоглобина и миоглобина крови вызывает зеленую окраску тестовой зоны.
pH	Тестовое поле диагностической полоски содержит двойной индикатор (2 % метиловый красный, 10 % бромтимоловый синий), который дает широкий диапазон окраски в диапазоне pH от 5,0 до 9,0 (оранжевый, желтый, зеленый, бирюзовый). При этом индикатор не реагирует на белок.
Нитриты	Тест зависит от трансформации нитратов в нитриты под воздействием грамположительных бактерий в моче. В забуференном тестовом поле импрегнирован амин и активатор (8,2 % 4-мышьяковая кислота и 2,6 % N-(нафтил)-этилендиаммония дигидрохлорид). Нитриты, присутствующие в моче, взаимодействуют и диазотируют амин (принцип Гриза). Протекающая реакция дает розовое окрашивание тестового поля диагностической полоски.
Лейкоциты	Тестовое поле содержит эфир индоксила (0,4 % дериватизированные гетероциклические карбоксилаты) и 0,2 % соли диазония. Эстераза гранулоцитов расщепляет эфир, в результате чего свободный индоксил реагирует с солями диазония, давая фиолетовое окрашивание тестового поля диагностической полоски.
Удельная плотность	Тестовое поле содержит детергент и краситель индикатор бромтимоловый синий (2,8 % дибромо-3-гидрокси-4-изопропил-толуол-сульфофталеин), который реагирует в присутствии ионов, содержащихся в моче, меняя окраску от сине-зеленой до зелено-желтой или коричневой.

Материал исследования

Модельные образцы мочи.

Проведение анализа

1. Извлечь из контейнера (тубуса) тест-полоску, затем тару следует плотно закрыть фабричной крышкой с осушителем. Полоску следует держать за свободный край подложки тест-полоски.
2. Мочу, приготовленную для анализа, следует тщательно перемешать стеклянной палочкой.

3. Полоску опустить на 1–2 с в исследуемую мочу так, чтобы все зоны были смочены одномоментно. При этом необходимо держать полоску в горизонтальном положении во избежание смешивания химических веществ из разных тестовых областей.
4. Капли мочи с полоски необходимо удалить, проведя длинным ребром полоски по краю сосуда с мочой, затем промокнуть полоску, прижимая ее край к фильтровальной бумаге или мягкой ткани.
5. Включить мочевой анализатор в сеть, затем нажать кнопку START на передней панели прибора.
6. Поместить полоску в направляющую панель (каретку) анализатора мочи тестовыми зонами вверх. При этом необходимо убедиться, что тест-полоска помещена правильно, т. е. конец полоски с индикаторными зонами упирается в левый блок каретки. Тест-полоска должна быть помещена в каретку в течение 50 с после погружения в мочу. Это время отображается на внешней панели анализатора индикаторами зеленого цвета каждые 5 с и последние три – индикаторами красного цвета, предупреждающими о том, что время инкубации заканчивается. После этого процесс анализа проводится автоматически путем последовательного измерения каждого тестового поля полоски.
7. Подождать, пока анализатор выведет каретку с полоской назад, и результаты будут распечатаны на принтере. При этом обратить внимание, что индикаторные светодиоды на внешней панели прибора загораются соответственно результату: зеленый цвет означает нормальный результат, красный цвет – патологический. Каждый индикатор соответствует определенному параметру, который обозначен тремя буквами на панели прибора.
8. Удалить использованную полоску из каретки и утилизировать ее. Очистить каретку, промыв под проточной водой.

Нормальные показатели

Параметр мочи, определяемый с помощью индикаторных полосок	**Значение параметра**
Билирубин	0–8,5 мкмоль/л
Уробилиноген	0–35 мкмоль/л
Кетоновые тела	0–0,5 ммоль/л
Аскорбиновая кислота	меньше 1,5 ммоль/л

Глюкоза	отсутствует или следовые количества 0,06–0,83 ммоль/л 0,03–0,05 г/сут
Белок	до 0,033 г/л
Кровь (гемоглобин)	отсутствует
pH (при смешанном пищевом режиме)	5,0–7,0
Нитриты	отсутствуют
Лейкоциты	отсутствуют
Удельная плотность мочи (при обычной водной нагрузке, в утренней порции) – у взрослых – у детей – у новорожденных – с 5 дня жизни и до 2 лет – в 2–3 года – в 4–5 лет – с 10 лет	 1,015–1,020 г/л 1,003–1,025 г/л до 1,018 г/л 1,002–1,004 г/л 1,010–1,017 г/л 1,012–1,020 г/л 1,011–1,025 г/л

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели и результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №3

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАТИВНОГО ПРЕПАРАТА МОЧЕВОГО ОСАДКА

Принцип исследования

Увеличение изображений объектов и/или деталей их структуры в нативном препарате мочи, невидимых невооруженным глазом, с помощью микроскопа.

Материал исследования

Модельные образцы мочи.

Проведение анализа

1. Перед исследованием мочу тщательно перемешать стеклянной палочкой, в центрифужную пробирку с градуировкой налить 10 мл и центрифугировать со скоростью 1500 об./мин в течение 10 минут.
2. Надосадочную часть мочи (прозрачный верхний слой) резким наклоном пробирки слить, оставляя в пробирке около 1 мл осадка.
3. Полученный осадок аккуратно перемешать, затем 1 каплю (около 40 мкл) перенести мягкой пастеровской пипеткой с баллончиком и тонко оттянутым концом на середину предметного стекла и накрыть покровным. При этом важно, чтобы капля мочи соответствовала размеру покровного стекла для образования монослоя элементов осадка мочи.

   Примечание: *вместо стеклянных предметных и покровных стекол можно использовать одноразовые пластиковые слайд-планшеты для исследования осадка мочи, что создаст более стандартные условия и упростит микроскопию.*
4. Приготовленный препарат поместить на предметный столик микроскопа, укрепить клеммами (боковыми зажимами).
5. Провести обзорное (ориентировочное) изучение препарата осадка мочи (распределение элементов в препарате) при малом увеличении (окуляр 10, объектив 10), опущенном конденсоре или при приподнятом конденсоре и максимально закрытой диафрагме.
6. Провести детальное изучение препарата осадка мочи (количество элементов, их распределение в препарате и морфологическая характеристика) при большом увеличении (окуляр 10, объектив 40), при этом опущенный конденсор поднять или, при поднятом до предела конденсоре, приоткрыть диафрагму. Если элементы осадка встречаются в каждом просмотренном поле зрения, то количественную оценку выразить их числом в поле зрения, при небольшом количестве элементов, когда они встречаются не в каждом поле зрения, – числом в препарате.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные параметры и результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Нормальные показатели

Элементы осадка мочи	Значение показателя
Клетки – переходного эпителия – плоского эпителия – почечного эпителия	 0–1 в препарате 0–3 в препарате отсутствуют
Лейкоциты: – у мужчин – у женщин – у детей	 0–3 в поле зрения 0–6 в поле зрения 0–6 в поле зрения
Эритроциты: – измененные – неизмененные: – у женщин – у мужчин	 отсутствуют 0–3 в препарате 0–1 в препарате
Слизь	отсутствует или небольшое количество
Кристаллические образования	отсутствуют
Цилиндры	отсутствуют или единичные гиалиновые
Бактерии	отсутствуют
Грибы	отсутствуют
Паразиты	отсутствуют

Контрольные вопросы:

1. С какой целью проводят обзорное микроскопическое исследование мочевого осадка?
2. Как приготовить влажный нативный препарат мочевого осадка?
3. Какие элементы организованного и неорганизованного осадков мочи можно обнаружить при детальном исследовании неокрашенного микропрепарата?
4. Какие физико-химические показатели мочи можно проанализировать с помощью мультииндикаторных диагностических полосок?
5. Почему запрещается прикасаться руками к зонам индикации полосок (в области нанесения реагента)?
6. Для каких целей проводят анализ содержания аскорбиновой кислоты в моче?

7. В чем основные преимущества использования слайд-планшетов для исследования осадка мочи перед стеклянными предметными и покровными стеклами?
8. При каких условиях проводят детальное изучение нативного препарата осадка мочи с помощью микроскопа?

ТЕМА 2.2. ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛА

ВВЕДЕНИЕ

Кал является разнородным по составу конечным продуктом обмена веществ организма. Формирование кала происходит в толстом кишечнике путем всасывания продуктов расщепления в результате сложных биохимических процессов.

Характер фекальных масс зависит от качества и количества потребляемых продуктов питания, состояния слизистых оболочек органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), работы желез желудка, кишечника, функций поджелудочной железы и желчевыделительной системы, состояния мышечной стенки кишечника, наличия пищеварительных ферментов и других факторов.

Лабораторный анализ содержимого толстого кишечника, выделяющегося при дефекации, необходим для обследования пациентов, страдающих от различных заболеваний пищеварительной системы или при подозрении на них, а также для мониторинга проводимого лечения патологий ЖКТ.

Химико-микроскопический (клинический) анализ кала представляет собой комплекс макроскопических, биохимических и микроскопических исследований.

Оценка физических параметров кала является необходимым критерием для суждения о функциональном состоянии ЖКТ. При макроскопическом изучении фекалий определяют их объем, цвет, консистенцию, форму, запах и видимые примеси.

Химическое исследование кала проводят по специальным показаниям с помощью монореагентных тест-полосок для обнаружения скрытой крови, стеркобилиногена, стеркобилина, билирубина, белка, лейкоцитов, оценки pH.

Микроскопическое исследование испражнений дает информацию о состоянии слизистой оболочки кишечника, позволяет судить о пищеварительной и моторной функциях органов ЖКТ. При микроскопии выявляют отделяющиеся в просвет кишечника клеточные элементы:

лейкоциты, эритроциты, макрофаги, кишечный эпителий, опухолевые клетки, а также небольшие комочки слизи, обнаруживают яйца гельминтов и паразитирующих в кишечнике простейших. Данные исследования проводят во влажных нативных и окрашенных препаратах кала.

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмом, принципами и методиками химико-микроскопического исследования фекалий.

Приобретение практических навыков по оценке физико-химических свойств образцов содержимого кишечника и микроскопическому исследованию влажного нативного и окрашенных препаратов кала.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Строение и функции кишечника. Процесс образования и выделения кала. Особенности пищеварения у детей грудного возраста.
2. Подготовка пациента к сдаче биоматериала для химико-микроскопических исследований содержимого кишечника (диеты Певзнера, Шмидта).
3. Порядок сбора образцов кала для различных видов исследования.
4. Условия доставки образцов кала в лабораторию. Критерии для отказа в приеме образцов кала на лабораторное исследование. Допустимое время хранения образцов кала для наиболее распространенных лабораторных исследований.
5. Методология макроскопической оценки физических (общих) свойств кала: количества, консистенции, формы, цвета, запаха и видимых примесей: обнаружение остатков непереваренной пищи, слизи, крови. Факторы и причины, обусловливающие физические свойства кала.
6. Методики приготовления каловой эмульсии, фекальной взвеси.
7. Технология оценки химических свойств каловой эмульсии с помощью тестовых полосок (pH, растворимого белка, стеркобилиногена, стеркобилина, билирубина, крови, лейкоцитов): принцип, значение и ограничения. Особенности использования реагентных полосок для общеклинического исследования кала.
8. Традиционные и современные методики обнаружения скрытой крови в кале и их значение в диагностике кровотечений из ЖКТ: амидопириновая, азопирамовая, гваяковая и другие пробы.

9. Иммунохроматографические экспресс-тесты для обнаружения скрытой крови в кале при скрининге колоректального рака: принцип работы, ограничения при использовании, интерпретация результатов.
10. Порядок и условия микроскопического (копрологического) исследования нативного и окрашенных препаратов кала.
11. Методы приготовления влажных микропрепаратов кала: нативного, нативного с глицерином; окрашенного раствором Люголя, раствором судана III, метиленовым синим.
12. Элементы испражнений, дифференцируемые в различных препаратах кала: слизь, цилиндрический эпителий, мышечные волокна, нейтральный жир, жирные кислоты, мыла, не- и переваренная клетчатка, крахмал (внутри- и внеклеточный), лейкоциты, эритроциты, кристаллические образования, кишечная микрофлора, простейшие, гельминты.
13. Обнаружение яиц острицы *Enterobius vermicularis* методом перианального соскоба, отпечатка кожи с анальной области, закладки ватного тампона.
14. Порядок и методы обеззараживания образцов фекалий, лабораторного инструментария, расходных материалов, используемых при работе с калом.
15. Референтные пределы и нормальные величины основных клинико-лабораторных параметров содержимого кишечника.
16. Возможные источники ошибок лабораторного исследования содержимого кишечника и факторы, влияющие на результат анализа.
17. Клинико-диагностическое значение химико-микроскопического исследования кала.
18. Процедуры контроля качества химико-микроскопического исследования кала (внутри- и межлабораторный контроли качества).

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Использование современных автоматизированных технологий для химико-микроскопического исследования кала.
2. Колоректальный рак: распространенность, симптомы, скрининг и диагностика.
3. Значение исследования фекального кальпротектина в кале при комплексной диагностике заболеваний кишечника.

Лабораторная работа №1

МАКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАЛА

Принцип исследования

Оценка физических показателей образца кала на основе анализа восприятий органов чувств.

Материал исследования

Модельные образцы фекалий.

Проведение анализа

1. *Форма и консистенция кала.* Определить форму образца кала в посуде, в которой он был доставлен в лабораторию, визуально. Консистенцию исследовать с помощью шпателя или деревянной палочки/лучины.
2. *Видимые посторонние примеси в кале.* Отобрать с помощью шпателя, деревянной палочки, лучины или иглы несколько комочков кала, растереть их с дистиллированной водой до состояния эмульсии и рассмотреть поочередно в чашке Петри на белом и черном фоне.
3. *Цвет и запах кала.* Определить органолептически.

Нормальные показатели

В норме фекалии взрослого человека при смешанном питании и нормальном пищеварении плотные (оформленные), без видимых посторонних примесей, коричневого цвета с нерезким каловым запахом.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели и результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №2

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЛА С ПОМОЩЬЮ МОНОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПОЛОСОК

Принцип исследования

В основе метода лежит эффект изменения окраски индикаторной зоны диагностической полоски в результате реакции красителя, при-

сутствующего в зоне индикации, с молекулами анализируемого вещества (pH, кровь, билирубин, стеркобилиноген, стеркобилин, белок, лейкоциты) каловой эмульсии.

Материал исследования

Модельные образцы фекалий.

Проведение анализа

1. Приготовить каловую эмульсию: небольшое количество фекалий (размером с лесной орех) поместить в центрифужную пробирку и, постепенно добавляя дистиллированную воду или физиологический раствор, растереть субстрат стеклянной палочкой до консистенции «густого сиропа» (разведение 1:6–1:10). Степень разведения зависит от характера кала, жидкий кал – не разводить. Можно приготовить 3 % эмульсию кала: 3 г исследуемого кала растереть в ступке с 10 мл дистиллированной воды.
2. Извлечь из контейнера (тубуса) полоску, затем тару следует плотно закрыть фабричной крышкой с осушителем. При этом запрещается прикасаться руками к зонам индикации полосок (в зоне нанесения реагента).
3. Каловую эмульсию, приготовленную для анализа, следует тщательно перемешать.
4. Стеклянной палочкой нанести каловую эмульсию на уголок реагентного поля диагностической полоски и включить секундомер. *Не рекомендуется покрывать все поле!*
5. По истечении времени, указанного в инструкции к тесту (60–120 секунд), сравнить полученную окраску реагентной зоны с цветовой шкалой на этикетке контейнера (пенала). *Изменение окраски или обесцвечивание реагентной зоны полоски, происходящее через 2 минуты, не учитывать!*

Нормальные показатели

Параметр кала, определяемый с помощью индикаторных полосок	**Значение параметра**
pH	
– у детей на грудном вскармливании	4,8–5,8
– у детей на искусственном вскармливании	6,8–7,5
– у детей старшего возраста и взрослых	7,0–7,5

растворимый белок	отсутствует
скрытая кровь	отсутствует
билирубин	отсутствует
стеркобилин	присутствует
лейкоциты	отсутствуют

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели и результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №3

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛАЖНЫХ ПРЕПАРАТОВ КАЛА

Принцип исследования

Увеличение изображений объектов и/или деталей их структуры во влажном нативном и окрашенных препаратах фекалий, невидимых невооруженным глазом, с помощью микроскопа.

Материал исследования

Модельные образцы фекалий.

Реактивы

- 0,9 % раствор NaCl;
- 20 % йодид калия;
- 50 % глицерин;
- кристаллический йод;
- раствор судана III;
- ледяная уксусная кислота;
- 96 % этиловый спирт;
- раствор метиленового синего 5 г/л.

Проведение анализа

Приготовление и исследование нативного препарата кала

1. На предметное стекло нанести 1–2 капли дистиллированной воды или изотонического раствора хлорида натрия, растереть в них с помощью стеклянной палочки небольшой комочек кала (размером

со спичечную головку) до получения суспензии, накрыть покровным стеклом.

2. Препарат рассмотреть сначала под малым (окуляр 7–10, объектив 8–10), а затем под большим (окуляр 7–10, объектив 40) увеличениями с целью обнаружения мышечных волокон, растительной клетчатки, нейтрального жира, жирных кислот, лейкоцитов, эритроцитов, кишечного эпителия, слизи, яиц гельминтов, простейших, кристаллов. *Исследовать не менее 2 препаратов!*

Приготовление и исследование препарата кала с глицерином

1. На предметное стекло нанести 1 каплю 50 % глицерина, растереть в ней с помощью стеклянной палочки небольшой комочек кала до получения суспензии, накрыть покровным стеклом.
2. Препарат рассмотреть сначала под малым (окуляр 7–10, объектив 8–10), а затем под большим (окуляр 7–10, объектив 40) увеличениями с целью обнаружения яйц гельминтов, которые просветляет глицерин, облегчая их распознавание.

Приготовление и исследование препарата кала, окрашенного раствором Люголя

1. Приготовить раствор Люголя: в мерную колбу на 50 мл внести 2 г йодида калия, прилить 10 мл дистиллированной воды, прибавить 1 г кристаллического йода и довести дистиллированной водой до метки.
2. На предметное стекло нанести 1 каплю свежеприготовленного раствора Люголя, растереть в ней с помощью стеклянной палочки небольшой комочек кала до получения суспензии, накрыть покровным стеклом.
3. Препарат рассмотреть сначала под малым (окуляр 7–10, объектив 8–10), а затем под большим (окуляр 7–10, объектив 40) увеличениями с целью обнаружения крахмальных зерен и йодофильной флоры, которые окрашиваются в сине-фиолетовый цвет.

Приготовление и исследование препарата кала, окрашенного раствором судана III

1. Приготовить раствор судана III: в колбе на 100 мл растворить 2 г судана III в 1 мл 96 % этилового спирта, прилить 90 мл ледяной уксусной кислоты.

2. На предметное стекло нанести 1 каплю свежеприготовленного раствора судана III, растереть в ней с помощью стеклянной палочки небольшой комочек кала до получения суспензии, накрыть покровным стеклом.
3. Препарат рассмотреть сначала под малым (окуляр 7–10, объектив 8–10), а затем под большим (окуляр 7–10, объектив 40) увеличениями с целью обнаружения капель нейтрального жира, которые окрашиваются в оранжевый, желтый или красный цвета.

Приготовление и исследование препарата кала, окрашенного раствором метиленового синего

1. Приготовить раствор метиленового синего (5 г/л): 0,5 г метиленового синего растворить в 100 мл дистиллированной воды.
2. На предметное стекло нанести 1 каплю свежеприготовленного раствора метиленового синего, растереть в ней с помощью стеклянной палочки небольшой комочек кала до получения суспензии, накрыть покровным стеклом.
3. Препарат рассмотреть сначала под малым (окуляр 7–10, объектив 8–10), а затем под большим (окуляр 7–10, объектив 40) увеличениями с целью обнаружения жирных кислот, которые окрашиваются в синий цвет, и капель нейтрального жира, которые не окрашиваются метиленовым синим, оставаясь бесцветными.

Нормальные показатели

Элементы кала	**Присутствие элемента в кале (в поле зрения)**
Мышечные волокна	Отсутствуют или содержатся единичные переваренные волокна
Соединительная ткань	Отсутствует
Нейтральный жир	Отсутствует или содержится в небольшом количестве
Жирные кислоты	Присутствуют в небольшом количестве
Мыла	Присутствуют в небольшом количестве
Перевариваемая клетчатка	Отсутствует
Крахмал	Отсутствует
Йодофильная флора	Отсутствует

Слизь	Отсутствует
Лейкоциты	Присутствуют единичные
Эритроциты	Отсутствуют
Яйца гельминтов	Отсутствуют
Простейшие	Отсутствуют

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели и результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №4

ОБНАРУЖЕНИЕ В ФЕКАЛИЯХ ЯИЦ ГЕЛЬМИНТОВ ПО МЕТОДУ КАТО

Принцип исследования

Обнаружение яиц гельминтов в толстом мазке фекалий по Като, просветленных глицерином и подкрашенных малахитовым зеленым, с помощью микроскопа.

Материал исследования

Модельные образцы фекалий.

Реактивы

- целлофановые покровные пластинки;
- смесь Като: 6 мл 3 % водного раствора малахитового зеленого, 500 г глицерина, 500 мл 6 % раствора фенола.

Проведение анализа

Подготовка к анализу

1. Для выполнения исследования рекомендуется использовать готовый набор реагентов. Реактив Като готов к применению.
2. Обработать гидрофильные целлофановые покровные пластинки реактивом Като: пластинки в количестве, необходимом для анализа, поместить в реактив Като так, чтобы они прилегали друг к другу, и выдержать 24 часа (10 мл реактива Като на 100 пласти-

нок). Готовые пластинки можно хранить в реактиве Като, при комнатной температуре в плотно закрытой емкости в течение срока годности набора.

Проведение анализа

3. 30–50 мг фекалий (величиной с горошину) нанести на предметное стекло и растереть стеклянной индивидуальной палочкой или лучиной.
4. Фекалии накрыть целлофановой покровной пластинкой, обработанной реактивом Като, и притереть в пределах пластинки пробкой из силиконовой резины до получения тонкого, равномерного прозрачного слоя.
5. Мазок оставить при комнатной температуре (18–25 °С) для просветления (время осветления мазка зависит от температуры воздуха в помещении), после чего просмотреть его под микроскопом: сначала под малым (окуляр 7–10, объектив 8–10), а затем под большим (окуляр 7–10, объектив 40) увеличениями.
6. Подсчитать обнаруженные яйца гельминтов во всем толстом мазке с учетом их предполагаемой видовой принадлежности (аскарида (*Ascaris lumbricoides*), власоглав (*Trichocephalus trichiurus*), широкий лентец (*Diphyllobothrium latum*), трематода (*Trematoda*), тениида (*Taeniidae*), в меньшей степени – анкилостома (*Ancylostoma duodenale*) и карликовый цепень (*Hymenolepis nana*)).

Нормальные показатели

В норме фекалии человека не содержат яиц гельминтов.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели и результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №5

ОБНАРУЖЕНИЕ СКРЫТОЙ КРОВИ В КАЛЕ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТОВЫХ КАССЕТ

Принцип исследования

Определение основано на принципе одноэтапного иммунохроматографического анализа (ИХА). Образец (фекальная взвесь) абсорбируется впитывающим участком иммунохроматографической полоски,

помещенной в кассету (планшет), и мигрирует вверх по мембране под действием капиллярных сил. При наличии в образце кала человеческого гемоглобина, последний вступает в реакцию со специфическими моноклональными антителами (АТ) к гемоглобину человека, связанными с частицами коллоидного золота и нанесенными на стартовую зону, образуя окрашенный иммунный комплекс. Данный комплекс движется с фронтом жидкости и вступает в реакцию с АТ, иммобилизованными на мембране в аналитической зоне тест-полоски. Если концентрация гемоглобина в анализируемом образце превышает пороговый уровень (около 6 мкг/г кала), то в тестовой зоне на уровне маркировок Т (тест) и С (контроль) выявляются две линии светло-фиолетового цвета.

Материал исследования

Модельные образцы фекалий.

Ход работы

Приготовление фекальной взвеси с помощью пробирки для отбора проб с экстрагирующим буфером

1. Для выполнения исследования рекомендуется использовать готовый набор реагентов. До проведения анализа образцы кала и компоненты теста (если тест-набор хранился в холодильнике) довести до комнатной температуры (18–25 °С). Индикаторный планшет, сборник с реагентом и аппликатором для подготовки образца готовы к использованию.
2. Снять крышку-капельницу с пробирки для отбора проб (сборника) и с помощью стержня (аппликатора) на крышке взять небольшое количество кала. Для этого неглубоко погрузить стержень (аппликатор) в 3 различных участка анализируемого образца кала так, чтобы на конце аппликатора осталось небольшое количество фекалий (примерно 100 мг кала). Если образец жидкий – пипеткой отобрать 100 мкл.
3. Излишки кала удалить с поверхности аппликатора сухой чистой фильтровальной бумагой.
4. Ввести стержень с образцом в пробирку с буфером для растворения образца и плотно закрутить крышку-капельницу. Несколько раз встряхнуть пробирку, чтобы облегчить растворение образца.

Проведение анализа

1. Вскрыть упаковку диагностического планшета (кассеты) вдоль прорези, извлечь планшет и положить на сухую чистую горизонтальную поверхность тестовой зоной вверх.
2. Перевернуть сборник и отвернуть крышку-капельницу. Внести в круглое окошко планшета (кассеты), маркированное буквой Т (тестовый образец), 2 капли (около 90 мкл) фекальной взвеси из сборника.
3. Через 5 минут визуально оценить результат реакции.

Интерпретация результатов тестирования

Положительный результат: если в анализируемом образце присутствует интактный человеческий гемоглобин – на тест-полоске образуются две параллельные окрашенные линии. Одна линия должна быть в контрольной области (С), а другая – в тестовой области (Т). Интенсивность окрашивания линии в тестовой области (Т) может варьировать в зависимости от концентрации гемоглобина в пробе, поэтому любая интенсивность окрашивания линии в тестовой области (Т) должна интерпретироваться как положительный результат.

Отрицательный результат: если в анализируемом образце отсутствует интактный человеческий гемоглобин – в контрольной области (С) появляется одна окрашенная линия.

Ошибка тестирования: из-за недостаточного объема пробы или неправильной процедуры проведения анализа контрольная линия может не появиться. В этом случае необходимо проверить методику выполнения процедуры и повторить анализ с новым тест-набором.

Нормальный показатель

У здорового человека концентрация гемоглобина в кале не превышает 6 мкг/г.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальный показатель и результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученного показателя и сделать вывод о возможной патологии.

Ответить на вопросы:

1. С какой целью проводят микроскопическое исследование препарата кала с глицерином; препарата кала, окрашенного раствором судана III?

2. Какие причины могут привести к ошибке тестирования фекальной взвеси на скрытую кровь с помощью ИХА?
3. Какие элементы можно обнаружить при детальном исследовании окрашенных микропрепаратов каловой эмульсии?
4. Какие физико-химические показатели кала можно определить с помощью моноиндикаторных диагностических полосок?
5. При каких условиях проводят обзорное и детальное изучение препаратов кала с помощью микроскопа?
6. Какие компоненты входят в состав реактива Като?
7. Какие физические показатели образца кала можно оценить на основе анализа восприятий органов чувств?
8. Яйца каких гельминтов можно обнаружить с помощью микроскопического исследования толстого мазка по Като?

ТЕМА 2.3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

ВВЕДЕНИЕ

Спинномозговая жидкость (цереброспинальная жидкость, ликвор, СМЖ) – это биологическая жидкость, находящаяся в чистом виде в желудочках головного мозга, ликворопроводящих путях, в подпаутинном пространстве головного и спинного мозга. СМЖ вырабатывается сосудистыми сплетениями в результате секреторного процесса железистого эпителия. Продукция и состав ликвора связаны с состоянием мозгового кровообращения, величиной внутричерепного давления, процессами тканевого обмена в мозге. Ликвор является составной частью гематоэнцефалического барьера (ГЭБ).

Физиологическая роль ликвора заключается в механической защите головного и спинного мозга от внешних воздействий, регуляции внутричерепного давления, поддержании осмотического давления в клетках мозга и его оболочках, транспорте различных метаболитов, иммунной защите.

Химический состав ликвора чрезвычайно сложен. СМЖ содержит белки, аминокислоты, витамины, ферменты, гормоны, минеральные вещества и др.

В условиях патологии центральной нервной системы (ЦНС) нарушение функционирования ГЭБ проявляется изменением состава ликвора и может быть важным патогенетическим фактором заболевания.

Цереброспинальную жидкость для лабораторного исследования получают путем пункции спинномозгового канала или желудочков мозга.

Большое диагностическое значение имеет химико-микроскопическое (общеклиническое) исследование ликвора.

Общеклиническое исследование СМЖ включает анализ физико-химических свойств и микроскопическое исследование с определением цитоза (количества клеток в 1 мкл жидкости) и дифференцированием клеточных элементов в окрашенных препаратах ликвора.

Лабораторный анализ ликвора используют с целью этиологической диагностики заболевания, уточнения патогенетических аспектов болезни, с дифференциально-диагностической целью, а также для мониторинга состава ликвора с целью оценки эффективности проводимой терапии.

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмом, принципами и методиками химико-микроскопического исследования ликвора.

Приобретение практических навыков по оценке физико-химических свойств образцов ликвора и микроскопическому исследованию клеточных элементов в окрашенных препаратах СМЖ.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Понятие о цереброспинальной жидкости, ее основных физиологических функциях. Механизмы образования спинномозговой жидкости.
2. Методы извлечения ликвора: люмбальная пункция, пункция субокципитальной области и мозговых желудочков.
3. Стандартизация, порядок сбора и условия транспортировки образцов ликвора для проведения химико-микроскопического анализа.
4. Методология макроскопической оценки физических свойств СМЖ (цвет, прозрачность, опалесценция, запах, относительная плотность, фибринозная (фибриновая) пленка).
5. Критерии отличия истинной эритроцитархии от «путевой» крови.
6. Технология анализа физико-химических свойств СМЖ с помощью тестовых полосок.
7. Биохимическое исследование ликвора: определение pH, общего белка и белковых фракций (унифицированный метод определения

белка с сульфосалициловой кислотой и сульфатом натрия; реакции Панди, Нонне–Апельта), крови, уровня глюкозы, электролитов (хлориды, натрий, калий и др.), метаболитов СМЖ (лактат, пируват и др.).

8. Методики приготовления препаратов СМЖ для микроскопического исследования.
9. Технология определения клеточного состава (цитоза) СМЖ.
10. Алгоритм подсчета количества клеточных элементов и их дифференциации (в счетной камере, исследование окрашенных препаратов). Возрастные особенности состава ликвора.
11. Клеточные элементы ликвора (микроскопическое исследование): лимфоциты, плазматические клетки, макрофаги, липофаги, нейтрофилы, эозинофилы, эпителиальные клетки (мезотелиальные, арахноэндотелиальные), атипичные клетки.
12. Референтные пределы и нормальные величины основных клинико-лабораторных параметров ликвора.
13. Возможные источники ошибок лабораторного исследования ликвора и факторы, влияющие на результат анализа.
14. Клинико-диагностическое значение химико-микроскопического исследования ликвора.
15. Процедуры контроля качества химико-микроскопического исследования ликвора (внутри- и межлабораторный контроли качества).

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Приготовление препаратов спинномозговой жидкости путем седиментации на аппарате Сайка.
2. Использование спинномозговой жидкости в лечебных целях: применение резервуаров Оммайя, Рикхема и др.

Лабораторная работа №1

МАКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

Принцип исследования

Оценка физических показателей образца ликвора на основе анализа восприятий органов чувств.

Материал исследования

Модельные образцы спинномозговой жидкости.

Проведение анализа

1. *Цвет ликвора.* Цвет ликвора определить визуально, сравнивая чистую стеклянную пробирку с биоматериалом с такой же пробиркой, наполненной дистиллированной водой, в проходящем свете на белом фоне.
2. *Запах ликвора.* Определить органолептически.
3. *Прозрачность ликвора.* Прозрачность ликвора определить визуально, сравнивая чистую стеклянную пробирку с материалом с такой же пробиркой, наполненной дистиллированной водой, в проходящем свете на черном фоне. Степень мутности выразить в 4-х крестной системе:

слабая опалесценция	+
легкое помутнение	++
умеренное помутнение	+++
значительное помутнение (хлопья мути)	++++

Нормальные показатели

В норме цереброспинальная жидкость бесцветная, прозрачная, без запаха.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели и результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных показателей и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №2

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПОЛОСОК

Принцип метода

В основе метода лежит эффект изменения окраски индикаторной зоны диагностической полоски в результате реакции красителя, присутствующего в зоне индикации, с молекулами анализируемого вещества (pH, относительная плотность, кровь, билирубин, белок, глюкоза, лейкоциты) ликвора.

Материал исследования

Модельные образцы спинномозговой жидкости.

Проведение анализа

1. Извлечь из контейнера (тубуса) полоску, немедленно плотно закрыть тару.
2. Ликвор, полученный для анализа, аккуратно перемешать стеклянной палочкой.
3. Полоску опустить на 1–2 с в исследуемый образец СМЖ так, чтобы все зоны были смочены одновременно. При этом необходимо держать полоску в горизонтальном положении во избежание смешивания химических веществ из разных тестовых областей.
4. Избыток образца СМЖ удалить прикосновением длинным ребром полоски к мягкой ткани, бумажной салфетке или фильтровальной бумаге.
5. Полоску оставить в горизонтальном положении на 60–120 с согласно прилагаемой инструкции. Затем необходимо сопоставить окраску зон индикации с соответствующей цветной шкалой на этикетке тубуса. *Изменение окраски или обесцвечивание реагентной зоны полоски, происходящее через 2 минуты, не учитывать!*

Нормальные показатели

Параметр люмбального ликвора, определяемый с помощью индикаторных полосок	**Значение параметра**
pH	7,35–7,40
Кровь	не обнаруживается
Глюкоза	обнаруживается (2,5–3,33 ммоль/л при количественном методе определения)
Билирубин	не обнаруживается
Белок – у новорожденных – у детей и взрослых	 обнаруживается (до 0,22–0,33 г/л при количественном методе определения) обнаруживается (до 0,60–0,90 г/л при количественном методе определения)

Лейкоциты	обнаруживаются (0–1 клетка на 1 мкл при количественном методе определения)
Относительная плотность	1,006–1,008

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные величины и результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных показателей и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА И БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ В СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

Качественное определение общего белка в ликворе (реакция Панди)

Принцип исследования

Белок с раствором фенола дает помутнение, интенсивность которого зависит от содержания белка.

Материал исследования

Модельные образцы спинномозговой жидкости.

Реактивы

- реактив Панди (фенол 2,5 г, дистиллированная вода 25 мл);
- кислота сульфосалициловая 0,24 моль/л, 6 %;
- натрий сернокислый 0,98 моль/л, 14 %;
- стандартный раствор общего белка, 10 г/л;
- аммоний сернокислый.

Проведение анализа

1. Для выполнения исследования рекомендуется использовать готовый набор реагентов. Реактивы готовы к использованию.
2. На предметное стекло нанести 2 капли готового реактива Панди, рядом поместить 2 капли СМЖ, так чтобы обе жидкости слились.
3. Через 2 минуты визуально на темном фоне учесть результаты реакции. Степень помутнения выразить в 4-х крестной системе:

слабая опалесценция	+
легкое помутнение	++
умеренное помутнение	+++
значительное помутнение (хлопья мути)	++++

Качественное определение глобулинов в ликворе (реакция Нонне–Апельта)

Принцип исследования

При взаимодействии глобулинов с насыщенным раствором сернокислого аммония в результате осаждения белковых фракций, неосажденных в реакции Панди, появляется помутнение, интенсивность которого зависит от содержания глобулинов.

Проведение анализа

1. В опытную пробирку внести 0,5 мл насыщенного раствора сернокислого аммония и 0,5 мл СМЖ, перемешать.
2. В пробирку с контрольной (холостой) пробой внести 1,0 мл дистиллированной воды.
3. Через 2 минуты визуально учесть результаты реакции, сравнивая опытную и контрольную пробы на темном фоне. *Помутнение СМЖ через 3 минуты и более не учитывать!* Степень помутнения выразить в 4-х крестной системе (как в реакции Панди).

Количественное определение общего белка в реакции с сульфосалициловой кислотой и натрием сернокислым

Принцип исследования

Белок с сульфосалициловой кислотой и натрием сернокислым дает помутнение раствора, интенсивность которого пропорциональна содержанию белка и определяется фотометрически при длине волны 410–480 нм.

Проведение анализа

1. Приготовить рабочий раствор: смешать раствор сульфосалициловой кислоты (6 %) и раствор натрия сернокислого (14 %) в соотношении 1:1. Раствор приготовить непосредственно перед применением, хранить при комнатной температуре не более 8 часов.

2. В опытную пробирку налить 5 мл свежеприготовленного рабочего раствора и 0,5 мл ликвора.
3. Из стандартного раствора общего белка приготовить серию разведений: в пять пробирок соответственно внести 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 и 1 мл реагента. Затем довести объем физиологическим раствором до 10 мл (концентрация белка в полученных стандартах составит соответственно 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 и 1 г/л).
4. Приготовить контрольную пробу: в пробирку налить 5 мл физиологического раствора и 0,5 мл ликвора.
5. Тщательно перемешать и инкубировать все приготовленные растворы при комнатной температуре в течение 10 минут.
6. Оценить помутнение образцов фотоэлектроколориметрически против контрольной пробы при длине волны 410–480 нм.
7. Построить калибровочный график и произвести по нему расчет концентрации белка.

Примечание: перед количественным определением целесообразно проводить качественную оценку содержания белка. Если при постановке реакции Панди результат оценивается как +++/++++, то следует развести ликвор физиологическим раствором и учесть степень разведения при интерпретации результатов.

Нормальные показатели

В норме концентрация белка у детей и взрослых в люмбальном ликворе – 0,22–0,33 г/л; в вентрикулярном ликворе – 0,12–0,20 г/л; в ликворе при цистернальной пункции – 0,10–0,22 г/л; у новорожденных – 0,60–0,90 г/л.

Минимальная определяемая концентрация глобулинов в люмбальном ликворе – 0,05 г/л (0,3 г/л общего белка).

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели и результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №4

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИКВОРА

Исследование содержимого фибринозной (фибриновой) пленки

Принцип исследования

Ликвор, содержащий большое количество грубодисперсных белков, сразу после выпускания сворачивается в виде желеобразного сгустка, внутри которого могут содержаться микобактерии туберкулеза (МБТ). Исследование содержимого сгустка на МБТ проводят с помощью микроскопа.

Материал исследования

Модельные образцы спинномозговой жидкости.

Реактивы

- карболовый фуксин по Цилю–Нильсену;
- 25 % серная кислота;
- 1 % раствор метиленового синего.

Проведение анализа

1. Фибринозная пленка может образоваться сразу после получения спинномозговой жидкости или через некоторое время (в течение 30 мин, 1 ч, 10–15 ч и более). Для обнаружения фибринозной пленки ликвор оставить в пробирке до образования «мешочка».
1. Из сформированного фибринового «мешочка» мягкой пастеровской пипеткой извлечь каплю спинномозговой жидкости с клетками, нанести на предметное стекло, накрыть покровным стеклом, окрасить по методу Циля–Нильсена (см. лабораторную работу №2 темы 2.4.). Микроскопировать с масляной иммерсией в световом микроскопе (окуляр 10, увеличение 100).

Нормальные показатели

В норме ликвор стерилен.

Подсчет количества форменных элементов ликвора и дифференциация клеточных элементов в счетной камере, в окрашенном препарате

Принцип исследования

Исследование проводят с помощью реактива Самсона. Реактив Самсона предотвращает цитоз клеток в течение нескольких часов. Уксусная кислота, которая содержится в реактиве, растворяет эритроциты, фуксин окрашивает ядра клеток в интенсивный красный цвет, что облегчает подсчет клеток и их дифференцирование. При помощи микроскопа и счетной камеры подсчитывают число в ликворе лейкоцитов после разрушения эритроцитов.

Реактивы

– реактив Самсона (кислота уксусная 5,3 моль/л; фенол 0,22 моль/л; фуксин основной 2 г/л; спирт этиловый 18 г/л).

Проведение анализа

1. Для выполнения исследования рекомендуется использовать готовый набор реагентов. Реактив Самсона готов к использованию.
2. Спинномозговую жидкость перемешать вращением пробирки между ладонями в течение 2–3 минут, затем смешать с реактивом Самсона в смесителе для лейкоцитов.
3. Реактив набрать до первой метки смесителя, до второй набрать спинномозговую жидкость. Если отсутствует смеситель, допускается смешивание спинномозговой жидкости с реактивом Самсона в соотношении: 10 капель СМЖ и 1 капля реактива Самсона на часовом стекле.
4. Встряхнуть смеситель и оставить на 10–15 минут для прокрашивания клеточных элементов.
5. Набрать смесь пипеткой и перенести в заранее подготовленную камеру Фукса–Розенталя (в случае отсутствия последней допускается использование камеры Горяева).
6. Посчитать лейкоциты на всей площади сетки камеры при малом увеличении микроскопа (окуляр 15, объектив 8). Для дифференциации клеток использовать окуляр 7, объектив 40.
7. Рассчитать по формуле количество клеток в 1 мкл ликвора (X) (при использовании камеры Фукса–Розенталя):

$$X = (A*11) / (3,2*10),$$

где А – количество клеток во всей камере; 3,2 – объем камеры, мкл, 11/10 – степень разведения СМЖ реактивом Самсона.

При использовании камеры Горяева количество клеток в 1 мкл (Х) рассчитать по формуле:

$$X = (A*11) / (0,9*10),$$

где А – количество клеток во всей камере; 0,9 – объем камеры, мкл, 11/10 – степень разведения СМЖ реактивом Самсона.

Рекомендуется посчитать не менее трех камер Горяева, взяв затем среднее арифметическое значение.

При подсчете цитоза указать, какими клеточными элементами он представлен.

Нормальные показатели

Цитоз (нормальное содержание лейкоцитов) в люмбальном ликворе у взрослых – $0–5*10^6$/л; у новорожденных – $20–25*10^6$/л; у детей до года – $14–20*10^6$/л; у детей старше 10 лет – $2–6*10^6$/л. Преобладают лимфоциты.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели и результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Ответить на вопросы:

1. С какой целью проводят микроскопическое исследование содержимого фибринозной (фибриновой) пленки, образующейся на поверхности ликвора?
2. Что такое цитоз, плеоцитоз?
3. Какие физико-химические показатели СМЖ можно определить с помощью мультииндикаторных диагностических полосок?
4. При каких условиях проводят микроскопическое изучение препаратов ликвора с целью определения цитоза и дифференциации клеточных элементов?
5. Какие компоненты входят в состав реактива Самсона?
6. Какие физические показатели образца СМЖ можно оценить на основе анализа восприятий органов чувств?
7. Какую счетную камеру предпочтительнее использовать для подсчета количества форменных элементов в ликворе?

ТЕМА 2.4. ИССЛЕДОВАНИЕ МОКРОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Мокрота – патологический секрет дыхательной системы, образующийся в результате заболевания, выделяемый с кашлем из дыхательных путей: легких, бронхов, трахеи и гортани. В состав мокроты могут входить слизь, серозная жидкость, кровь, гной, продукты распада тканей (волокнистые и кристаллические образования), различные микроорганизмы. В мокроте также могут содержаться примеси в виде остатков пищи из полости рта и слюны, патологические элементы из прилегающих к легким органов.

Химико-микроскопический (общеклинический) анализ мокроты – лабораторное исследование, которое позволяет оценить общие физико-химические свойства и микроскопические особенности мокроты и дает представление о патологическом процессе в дыхательных органах.

При клиническом исследовании мокроты анализируются такие показатели, как количество, цвет, запах, характер, консистенция, деление на слои, клеточный состав, наличие примесей, волокнистых и кристаллических образований; выявляется присутствие бактерий, грибов, паразитов.

Микроскопия мокроты – трудоемкое исследование. Это обусловлено низкой концентрацией диагностически ценных клеток на единицу площади препарата, их дегенерацией под действием ферментов слюны, загрязнением препарата клеточными и пищевыми элементами полости рта.

В клинической практике химико-микроскопический анализ мокроты проводят при наличии у пациента кашля с выделениями; при уточненном или неясном процессе в грудной клетке по данным аускультации или рентгенологического обследования; при заболеваниях легких и бронхов (бронхите, пневмонии, бронхиальной астме, хронической обструктивной болезни легких, туберкулезе, бронхоэктатической болезни, новообразованиях органов дыхания, грибковой или глистной инвазии легких, интерстициальных заболеваниях легких).

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмом, принципами и методиками химико-микроскопического исследования мокроты.

Приобретение практических навыков по оценке физических свойств образцов мокроты и микроскопическому исследованию окрашенных препаратов мокроты.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Общие понятия о мокроте: определение, механизм образования.
2. Стандартизация сбора, транспортировки, хранения мокроты для проведения химико-микроскопического анализа.
3. Правила отбора поступающего в лабораторию клинического материала (мокроты). Алгоритм и методы обеззараживания биоматериала.
4. Методология оценки общих физических свойств мокроты: количество, цвет, консистенция, запах, pH, деление на слои, состав (характер): наличие слизи, гноя, крови, серозной жидкости, фибрина.
5. Методики приготовления нативных и окрашенных препаратов мокроты.
6. Видимые элементы мокроты в нативных препаратах: клеточные (лейкоциты, эозинофилы, эритроциты, клетки плоского эпителия, цилиндрического мерцательного эпителия, альвеолярные макрофаги, пылевые клетки (кониофаги), сидерофаги); волокнистые (эластические волокна, обызвествленные эластические волокна, спирали Куршмана); кристаллические (кристаллы Шарко–Лейдена, гематоидина, холестерина).
7. Клеточные элементы мокроты в окрашенных препаратах: нейтрофилы, эозинофилы, лимфоциты, базофилы, гистиоциты, альвеолярные макрофаги, клетки инородных тел, эпителиоидные клетки, клетки Пирогова–Лангханса, плоского эпителия, эпителия бронхов, реснитчатые клетки, бокаловидные клетки.
8. Бактериоскопическое исследование препаратов мокроты: техника приготовления и окраски препаратов (окраска по Граму, Цилю–Нильсену); условия исследования под микроскопом; метод флотации (всплывания) по Поттенджеру.
9. Показатели клинических лабораторных параметров мокроты.
10. Возможные источники ошибок исследования мокроты и факторы, влияющие на результат анализа.
11. Клинико-диагностическое значение химико-микроскопического и бактериологического исследований мокроты.
12. Процедуры контроля качества химико-микроскопических исследований мокроты.

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Основы бактериологического анализа мокроты.
2. Особенности получения мокроты больными туберкулезом легких.
3. Люминесцентная и светодиодная бактериоскопия в диагностике туберкулеза легких.

Лабораторная работа №1

МАКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОКРОТЫ

Принцип исследования

Оценка физических показателей образца мокроты на основе анализа восприятий органов чувств.

Материал исследования

Модельные образцы мокроты.

Проведение анализа

1. *Все манипуляции с образцами мокроты выполнять только на лотке, который дезинфицируется каждый день после использования пламенем или обработкой 50 г/л раствором хлорамина!*
2. *Количество образца мокроты.* Определить визуально в стеклянном градуированном сосуде или непосредственно в градуированном контейнере для сбора биоматериала.
3. *Цвет, прозрачность и характер мокроты.* Доставленную мокроту вылить в чашку Петри, располагая ее на белом и черном фоне, определить визуально цвет, прозрачность и характер (оценить видимые патологические примеси: слизь, гной, кровь и их преобладание над другими составными частями мокроты).
4. *Запах мокроты.* Определить органолептически.
5. *Консистенция мокроты.* С помощью препаровальной иглы или деревянной лучины подтянуть мокроту над чашкой Петри. Оценить консистенцию мокроты по наличию и характеру образующейся нити секрета.
6. *Деление мокроты на слои.* Свежевыделенную мокроту оставить отстаиваться (не более 2 часов) до появления характерных слоев. Визуально оценить наличие слоев, посчитать их количество и описать характер (состав) каждого из образованных слоев.

Нормальные показатели

У здоровых людей мокрота не выделяется. В сутки у здорового человека продуцируется около 10–15 мл дыхательного секрета, который осуществляет защитную и очистительную функции. В норме секрет бесцветный, прозрачный, не имеет запаха, однородный (на слои не делится). Консистенция мокроты зависит от состава (характера): вязкая – при наличии слизи или гноя, студенистая – при наличии большого количества фибрина, жидкая – при наличии серозной жидкости.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №2

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОКРАШЕННЫХ ПО ЦИЛЮ–НИЛЬСЕНУ ПРЕПАРАТОВ МОКРОТЫ

Принцип исследования

Краситель Циля–Нильсена используется для обнаружения кислото- и спиртоустойчивых бактерий (микобактерий туберкулеза).

Метод окраски по Циль–Нильсену основан на способности клеток кислотоустойчивых микроорганизмов (КУМ), предварительно фиксированных и окрашенных при прогревании основным фуксином Циля, прочно удерживать окраску после обработки раствором минеральной кислоты и не обесцвечиваться кислотным раствором спирта.

При этом окрашенные микроорганизмы (некислотоустойчивые бактерии) обесцвечиваются и дополнительно докрашиваются контрастным красителем.

Материал исследования

Модельные образцы мокроты.

Реактивы

- карболовый фуксин по Цилю–Нильсену;
- 25 % серная кислота;
- 1 % раствор метиленового синего.

Ход работы

Приготовление мазков

1. Предметные стекла перед использованием необходимо тщательно помыть и обезжирить.
2. С помощью специальных инструментов для приготовления препаратов мокроты нанести на стекло мазок из отдельных составных фрагментов: плотных участков слизи, тяжей, прожилок, крупинок. Высушить его на воздухе.
3. Мазок зафиксировать посредством несильного нагревания (примерно до 70 °С) предметного стекла, которое для этого трижды провести в верхней трети пламени горелки (спиртовки) мазком вверх в течение 5 секунд (до исчезновения признаков запотевания стекла). *Не допускать фиксации над племенем горелки влажных препаратов!*

Приготовленные мазки должны быть правильной толщины. Слишком тонкие мазки могут привести к ложноотрицательному результату, а толстые плохо фиксируются и прокрашиваются. Из составных частей полиморфной мокроты необходимо приготовить не менее 2-х, а при необходимости – 3–4-х комплексных препаратов!

Проведение анализа

1. Поместить на фиксированный мазок полоску фильтровальной бумаги (для предотвращения дальнейшего распределения краски по всему предметному стеклу).
2. Нанести с помощью пипетки избыток (3–4 капли) раствора карболового фуксина так, чтобы он покрыл всю полоску фильтровальной бумаги.
3. Нагреть препарат над пламенем горелки до появления легкого облачка паров, не допуская закипания краски и подсыхания бумаги.
4. Охладить мазок до комнатной температуры.
5. Процедуру по п.п. 3–4 повторить еще 2 раза.
6. Удалить пинцетом фильтровальную бумагу.
7. Остатки краски осторожно смыть с оборотной стороны предметного стекла слабой струей холодной воды в течение 30 с.
8. Покрыть всю поверхность препарата обесцвечивающим раствором (25 % серной кислотой) в течение 3–5 с до появления желтоватого оттенка мазка.
9. Тщательно смыть реагент проточной водой в течение 10 с.

10. Поместить мазок в 1 % раствор метиленового синего на 1–2 минуты.
11. Промыть в проточной воде 1 минуту. Высушить на воздухе при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.
12. Провести микроскопическое исследование окрашенного препарата с масляной иммерсией с помощью светового микроскопа (окуляр 10, объектив 100). Проанализировать не менее 300 полей зрения. Определить наличие и провести подсчет КУМ.

Учет результатов

При окраске карболовым фуксином КУМ (микобактерии туберкулеза) выявляются в виде тонких, слегка изогнутых палочек малиново-красного цвета, содержащих различное количество гранул. Микроорганизмы, располагающиеся поодиночке, парами или в виде групп, хорошо выделяются на голубом фоне других компонентов препарата. Нередко бактериальные клетки могут располагаться в виде римской цифры «V».

Интерпретация результатов микроскопического исследования мокроты, окрашенной по методу Циля–Нильсена

Результат исследования	*Число полей зрения (п/з), обязательных для просмотра*	*Интерпретация результата исследования*
КУМ не обнаружены	300	Отрицательный
1–2 КУМ	300	Результат не оценивается, рекомендуется повторить исследование
1–9 КУМ	100	Положительный, указывают точное число КУМ
10–99 КУМ	100	Положительный, «+» (единичные КУМ в п/з)
1–10 КУМ в п/з	50	Положительный, «++» (умеренное количество КУМ в п/з)
Более 10 КУМ в п/з	20	Положительный, «+++» (значительное количество КУМ в п/з)

Нормальные показатели

В дыхательном секрете здорового человека кислотоустойчивые микроорганизмы не выявляются.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о наличии патологии.

Ответить на вопросы:

1. Сколько комплексных микропрепаратов из составных частей полиморфной мокроты рекомендуется приготовить при химико-микроскопическом исследовании биоматериала?
2. Для каких целей в методике окраски препаратов мокроты по Цилю–Нильсену используется карболовый фуксин?
3. Как определить консистенцию и характер образца мокроты?
4. При каких условиях проводят микроскопическое изучение окрашенных препаратов мокроты с целью обнаружения кислотоустойчивых микроорганизмов?
5. Для чего на фиксированный мазок препарата мокроты помещают полоску фильтровальной бумаги перед окраской по методу Циля–Нильсена?
6. Какие физические показатели образца мокроты можно оценить на основе анализа восприятий органов чувств?
7. Как выглядят кислотоустойчивые бактерии при окраске карболовым фуксином под световым микроскопом?

РАЗДЕЛ 3

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

ТЕМА 3.1. ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА ЛИПИДОВ И ИХ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Липиды – большая группа разнообразных по химическому строению веществ, характеризующихся способностью хорошо растворяться в органических растворителях (метаноле, ацетоне, хлороформе, бензоле) и не растворяться в воде. Липиды разделяют на классы, в которые объединяют молекулы, имеющие сходное химическое строение и общие биологические свойства. В тканях человека количество разных классов липидов существенно различается. Большинство липидов имеют в своем составе жирные кислоты, связанные сложноэфирной связью с глицеролом, холестеролом, или амидной связью с аминоспиртом сфингозином. Правильный качественный и количественный состав липидов клетки определяет ее возможности, активность и выживаемость. Нарушения обмена липидов приводят к развитию многих заболеваний.

Липидный профиль крови – комплекс специфических анализов крови, позволяющий определить отклонения в жировом обмене организма. Основной целью исследования липидного обмена в клинической практике являются обнаружение и верификация дислипопротеинемии как одного из главных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Исследование липидного спектра крови проводят при ишемической болезни сердца, нарушениях мозгового кровообращения и кровотока в крупных артериях, при наличии локальных липидных отложений, у лиц с отягощенной наследственностью.

При исследовании липидного профиля крови определяют такие показатели, как уровень триглицеридов, общего холестерола (холестерина), липопротеинов высокой, низкой и очень низкой плотностей. Рассчитывают коэффициент атерогенности.

Холестерин является важным органическим веществом. Он синтезируется, главным образом, печенью (эндогенный холестерин), а также частично поступает в организм с пищей (экзогенный холестерин). Холестерин формирует клеточные мембраны всех органов и тканей организма, является предшественником стероидных гормонов, принимает участие в синтезе желчных кислот. В крови холестерин циркулирует в комплексе с белками, формируя липопротеины (ЛП).

Липопротеины высокой плотности (ЛПВП) удаляют избыток свободного холестерина, накопившегося в периферических клетках. Они транспортируют холестерин в печень, где он катаболизируется с образованием жирных кислот, либо передают его липопротеинам очень низкой плотности (ЛПОНП), в результате чего последние превращаются в липопротеины низкой плотности (ЛПНП). ЛПВП являются антиатерогенными факторами, препятствующими образованию атеросклеротической бляшки в сосуде. Пониженный уровень ЛПВП в крови говорит о возможности развития заболевания.

Триглицериды (ТГ) представляют собой соединение эфиров жирных кислот и глицерина и являются источником энергии для организма. Преобладающее количество ТАГ находится в жировой ткани, и только небольшой их уровень определяется в крови. Они поступают с пищей или ресинтезируются в печени. Большинство ТАГ транспортируются кровью в составе ЛПОНП. Повышенный уровень ТАГ нередко сочетается с сахарным диабетом, ожирением, артериальной гипертензией и изменением других показателей липидограммы.

Коэффициент атерогенности, который представляет собой отношение разницы между общим холестерином и ЛПВП и ЛПВП, указывает на повышенный риск развития сердечно-сосудистых заболеваний.

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмами, принципами и методиками биохимического и иммунологического исследований показателей обмена липидов и их клинико-диагностическим значением.

Приобретение практических навыков по определению концентрации общего холестерина, ЛПВП и уровня триглицеридов в крови.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Особенности подготовки пациентов для сдачи крови на исследование липидного спектра.
2. Шприцевые и вакуумные системы для взятия крови: принцип работы, преимущества и недостатки использования. Системы для взятия крови BD VACUTAINER и «SANLI Vacu Lab». Рекомендуемые буквенные и цветовые коды для идентификации добавок в вакуумных и невакуумных одноразовых контейнерах для сбора образцов венозной крови (ГОСТ ISO 6710-2011). Особенности взятия венозной крови у новорожденных.
3. Стандартизация сбора, транспортировки и хранения проб клинического материала для анализа липидного спектра крови.
4. Понятие о липидах и их обмене: определение, классификации, функции в организме человека. Роль апобелков в составе липопротеинов.
5. Понятие о триглицеридах. Основные методы лабораторного исследования триглицеридов и их клинико-диагностическое значение.
6. Понятие об общем холестерине (холестероле). Основные методы лабораторного исследования общего холестерина в сыворотке и плазме крови (реакция Либерманна–Бурхарда (метод Илька); энзиматический колориметрический метод) и его клинико-диагностическое значение (гипер- и гипохолестеринемия).
7. Понятие о липопротеинах высокой плотности (α-холестерин, α-липопротеины, ЛПВП). Основные методы лабораторного исследования липопротеинов высокой плотности и их клинико-диагностическое значение.
8. Индекс (коэффициент) атерогенности (ИА): значение определения, метод расчета (А.Н. Климов, 1995 г.) и рекомендуемые предельные значения.
9. Классификация гиперлипопротеинемий (принятая ВОЗ в качестве международной стандартной номенклатуры) по Д.С. Фредриксону и соавт. (1967 г.).
10. Понятие о липопротеинах низкой плотности (β-липопротеины, ЛПНП). Основные лабораторные методы расчета концентрации липопротеинов низкой плотности (турбидиметрический метод по Бурштейну и Самаю) и их клинико-диагностическое значение.

11. Понятие о липопротеинах очень низкой плотности (пре-β-липопротеины, ЛПОНП). Основные методы лабораторного исследования липопротеинов очень низкой плотности и их клинико-диагностическое значение.
12. Понятие об аполипротеинах A-I, A-II и аполипопротеине B (апо A-I, апо A-II и апо B). Основные методы лабораторного исследования аполипротеинов A-I, A-II и аполипопротеина B и их клинико-диагностическое значение.
13. Численные значения показателей оптимального холестерин-липопротеинового профиля сыворотки крови человека.
14. Возможные источники ошибок исследования липидного спектра крови и факторы, влияющие на результат анализа.
15. Процедуры контроля качества биохимического анализа липидов и аполипротеинов крови (внутри- и межлабораторный контроли качества).
16. Понятие о контрольных сыворотках на основе человеческой матрицы: понятие, особенности аттестованных и неаттестованных контрольных материалов.
17. Классификации биохимических автоматических анализаторов: по целям исследования; по принципу функционирования; по последовательности выполнения анализов (BATCH-системы, системы RANDOM); по производительности; по габаритам и массе приборов; по открытости системы.

ТЕМА ДЛЯ РЕФЕРАТИВНОГО СООБЩЕНИЯ

1. Использование автоматизированных технологий для исследования липидного спектра крови человека: приборы для анализа липидного спектра крови (Accutrend Plus, CHOLESTECH LDX и др.; портативные биохимические экспресс-анализаторы крови (CardioChek, EasyTouch и др.), ключевые принципы функционирования, основные преимущества и недостатки использования данного вида оборудования.

Лабораторная работа №1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип исследования

В основе анализа – энзиматический колориметрический метод. Определение холестерина основано на катализируемом ферментами

(холестеринэстеразой, холестеринoксидазой) последовательном превращении эфиров холестерина в холестенон и перекись водорода. Перекись водорода окисляет субстраты пероксидазы с образованием окрашенного соединения (хинониминовый краситель), интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации холестерина в образце и измеряется фотометрически при длине волны 500 (490–520) нм.

Материал исследования

Образцы контрольной сыворотки на основе человеческой матрицы или модельные образцы сыворотки.

Реактивы

– реагент 1 – буфер;
– реагент 2 – лиофилизат;
– калибратор – раствор холестерина 5,17 ммоль/л.

Проведение анализа

1. Для проведения исследования рекомендуется использовать готовый набор реагентов. Калибратор готов к использованию.
2. Подготовить рабочий реагент: содержимое (лиофилизат) одного флакона с реагентом 2 растворить в содержимом одного флакона с реагентом 1, аккуратно перемешать. Рабочий реагент готов к применению через 2 минуты после растворения.
3. Отобрать необходимые компоненты реакционной смеси с использованием пипеточных дозаторов в объемах, указанных в таблице:

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Рабочий реагент, мл	1,0	1,0	1,0
Сыворотка, мкл	10	-	-
Калибратор, мкл	-	10	-
Вода дистиллированная, мкл	-	-	10

4. Реакционную смесь тщательно перемешать и инкубировать не менее 15 минут при 18–25 °С или 10 минут при 37 °С.

5. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 500 (490–540) нм. *Окраска стабильна не менее 1 часа после инкубации.*
6. Рассчитать концентрацию общего холестерина в сыворотке крови (С, ммоль/л) по формуле:

*С=(Е опытной пробы/Е калибровочной пробы)*5,17 ммоль/л,*

где *Е опытной пробы* – оптическая плотность исследуемой пробы; *Е калибровочной пробы* – оптическая плотность калибровочной пробы, *5,17 ммоль/л* – концентрация холестерина в калибраторе.

Нормальные показатели

Нормальные значения содержания общего холестерина в сыворотке крови зависят от возраста, пола, характера питания. Дети и подростки (12–18 лет) – менее 4,39 ммоль/л; взрослые – менее 5,15 ммоль/л.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о наличии патологии.

Лабораторная работа №2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ТРИГЛИЦЕРИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип исследования

В основе анализа – энзиматический колориметрический метод. Липаза катализирует гидролиз липидов до глицерина и жирных кислот. Глицерин запускает ряд сопряженных ферментативных реакций с участием ферментов глицерокиназы в присутствии АТФ и глицерол-фосфатоксидазы. Образующаяся в ходе данных реакций перекись водорода при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминовый краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию триглицеридов в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 500 (490–540) нм.

Материал исследования

Образцы контрольной сыворотки на основе человеческой матрицы или модельные образцы сыворотки.

Реактивы

- монореагент 1;
- калибратор – раствор триглицеридов 2,29 ммоль/л.

Проведение анализа

1. Для проведения исследования рекомендуется использовать готовый набор реагентов. Монореагент и калибратор готовы к применению.
2. Отобрать компоненты реакционной смеси с использованием пипеточных дозаторов в объемах, указанных в таблице:

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Монореагент, мл	1,0	1,0	1,0
Сыворотка, мкл	10	-	-
Калибратор, мкл	-	10	-
Вода дистиллированная, мкл	-	-	10

3. Реакционную смесь тщательно перемешать и инкубировать не менее 15 минут при 18–25 °С или 10 минут при 37 °С.
4. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 500 нм (490–540 нм). *Окраска растворов стабильна не менее 1 часа после инкубации!*
5. Рассчитать концентрацию триглицеридов сыворотки крови (С, ммоль/л) по формуле:

$$C=(E\ опытной\ пробы/E\ калибровочной\ пробы)*2{,}29\ ммоль/л,$$

где *Е опытной пробы* – оптическая плотность исследуемой пробы; *Е калибровочной пробы* – оптическая плотность калибровочной пробы, *2,29 ммоль/л* – концентрация триглицеридов в калибраторе.

Нормальные показатели

Нормальные значения содержания триглицеридов в сыворотке крови зависят от возраста, пола, характера питания. Взрослые – менее 0,15–1,71 ммоль/л.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о наличии патологии.

Лабораторная работа №3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип исследования

Содержащиеся в сыворотке крови ЛПОНП и ЛПНП образуют нерастворимые комплексы с фосфорновольфрамовой кислотой и ионами магния. Полученная после осаждения преципитата надосадочная жидкость используется для определения холестерина ЛПВП (ЛПВП-ХС) энзиматическим колориметрическим методом.

Материал исследования

Образцы контрольной сыворотки на основе человеческой матрицы или модельные образцы сыворотки.

Реактивы

- реагент 1 – буфер;
- реагент 2 – лиофилизат;
- реагент 3 – осаждающий реагент;
- калибратор – раствор холестерина ЛПВП 1,29 ммоль/л.

Проведение анализа

1. Для выполнения анализа рекомендуется использовать готовый набор реагентов. Осаждающий реагент и калибратор готовы к применению.
2. Подготовить пробы следующего состава для преципитации:

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Осаждающий реагент, мкл	300	300	300
Сыворотка, мкл	150	-	-
Калибратор, мкл	-	150	-
Вода дистиллированная, мкл	-	-	150

3. Пробы перемешать и инкубировать в течение 10 минут при 18–25 °С.
4. Центрифугировать пробы в течение 10 минут при 4000 g.
5. Отобрать прозрачный супернатант и использовать его для определения концентрации холестерина ЛПВП.
6. Подготовить рабочий реагент для определения холестерина: содержимое (лиофилизат) одного флакона с реагентом 2 растворить в содержимом одного флакона с реагентом 1, аккуратно перемешать. Рабочий реагент готов к применению через 2 минуты после растворения.
7. Смешать приготовленный рабочий реагент и супернатант опытной пробы в соотношении 10:1 и инкубировать не менее 15 минут при 18–25 °С или 10 минут при 37 °С. Аналогично обработать супернатанты калибровочной и контрольной проб.
8. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 500 (490–540) нм. *Окраска проб стабильна не менее 1 часа после инкубации!*
9. Произвести расчет концентрации холестерина ЛПВП в сыворотке крови (С, ммоль/л) по формуле:

$$C=(E \text{ опытной пробы}/E \text{ калибровочной пробы})*1{,}29 \text{ ммоль/л},$$

где *Е опытной пробы* – оптическая плотность исследуемой пробы; *Е калибровочной пробы* – оптическая плотность калибровочной пробы, *1,29 ммоль/л* – концентрация холестерина ЛПВП в калибраторе.

10. Рассчитать индекс атерогенности (ИА), используя формулу:

$$ИА = (ОХС–ЛПВП) / ЛПВП,$$

где *ИА* – индекс атерогенности; *ОХС* – концентрация общего холестерина в сыворотке крови, *ЛПВП* – концентрация холестерина липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови.

Нормальные показатели

Нормальные значения содержания общего холестерина ЛПВП в сыворотке крови зависят от возраста, пола, характера питания. Взрослые – более 1,42 ммоль/л. В норме значение индекса атерогенности не должно превышать 3,0.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о наличии патологии.

Ответить на вопросы:

1. На чем основан принцип определения уровня холестерина ЛПВП в сыворотке крови?
2. Для каких целей в методике определения уровня холестерина ЛПВП в сыворотке крови используется фосфорновольфрамовая кислота и ионы магния?
3. От чего зависит уровень общего холестерина в сыворотке крови человека?
4. Почему в методике определения уровня общего холестерина предпочтительнее использовать готовый монореагент?
5. Какую клинико-диагностическую информацию дает расчет индекса атерогенности?
6. По какой формуле производится расчет индекса атерогенности?
7. Какую длину волны рекомендуется использовать для определения концентрации ТАГ при энзиматическом колориметрическом методе?

ТЕМА 3.2. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФАРКТА МИОКАРДА

ВВЕДЕНИЕ

Инфаркт миокарда (ИМ) является наиболее тяжелой формой ишемической болезни сердца (ИБС) и представляет собой развитие одного или нескольких очагов некроза в сердечной мышце в связи с острым прекращением коронарного кровообращения в данном участке.

В диагностике острого ИМ лабораторные методы исследования занимают заметное место наряду с функциональными.

Лабораторное подтверждение острого инфаркта миокарда основано на выявлении неспецифических показателей тканевого некроза, воспалительной реакции миокарда и гиперферментемии (последняя входит в классическую триаду признаков острого инфаркта миокарда: болевой синдром, типичные изменения ЭКГ, гиперферментемия).

Основными клинико-лабораторными признаками, отражающими процессы тканевого некроза и воспалительной реакции миокарда, являются: повышение температуры тела, лейкоцитоз, анэозинофилия, небольшой палочкоядерный сдвиг формулы крови влево, увеличение СОЭ. Правильная интерпретация значений этих показателей возможна только при сопоставлении с клинической картиной заболевания и данными ЭКГ.

Наиболее ценным для диагностики острого ИМ является определение активности некоторых ферментов в сыворотке крови. Основной причиной повышения активности и/или содержания энзимов в сыворотке крови у больных острым ИМ является разрушение кардиомиоцитов и выход клеточных ферментов в кровь. Энзимодиагностика включает в себя определение активности/концентрации креатинфосфокиназы (КФК) и ее МВ-фракции (МВ-КФК), тропонинов, миоглобина.

В настоящее время разработан широкий спектр методов определения тропонинов и других кардиомаркеров: бесприборный качественный анализ тест-системами, полуколичественный экспресс-анализ на портативных приборах, количественный анализ на автоматических анализаторах.

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмом клинико-лабораторной диагностики острого инфаркта миокарда, принципами и методиками ферментативной диагностики острого инфаркта миокарда и их значением.

Приобретение практических навыков по полуколичественному определению маркеров ранних повреждений миокарда в цельной крови/сыворотке.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Понятие об инфаркте миокарда, причины развития, классификации по различным признакам (по стадиям развития, по объему поражения, по течению и пр.), возможные осложнения и особенности реабилитации после перенесенного инфаркта миокарда.
2. Ключевые диагностические критерии инфаркта миокарда: изменение клинической картины в зависимости от периода болезни (физикальное обследование).
3. Ключевые диагностические критерии инфаркта миокарда: данные ЭКГ-исследований (инструментальное исследование).

4. Алгоритм лабораторной диагностики инфаркта миокарда. Понятие о сывороточных биомаркерах инфаркта миокарда. Роль миокардиальных маркеров в диагностике инфаркта миокарда. Динамика изменений концентрации и активности миокардиальных маркеров при остром инфаркте миокарда. Временные интервалы диагностической значимости исследования активности/концентрации ферментов крови при остром инфаркте миокарда.
5. Принципы и методики ферментативной диагностики острого инфаркта миокарда: оценка содержания в крови миоглобина; белка, связывающего жирные кислоты (БСЖК); активности и массовой концентрации МВ-фракции креатинкиназы; уровня сердечных тропонинов Т и I.
6. Референтные величины содержания в крови миоглобина; кардиальной формы БСЖК; сердечных тропонинов Т и I; сывороточной активности фермента креатинкиназы и его МВ-фракции.
7. Изменения уровня/активности миокардиальных маркеров при других заболеваниях.
8. Дополнительные лабораторные диагностические критерии инфаркта миокарда: оценка неспецифических показателей тканевого некроза и воспалительной реакции миокарда.
9. Возможные источники ошибок лабораторного исследования крови при подозрении на инфаркт миокарда и факторы, влияющие на результат анализа.
10. Процедуры контроля качества биохимического и иммунологического исследований кардиомаркеров в сыворотке/плазме крови (внутри- и межлабораторный контроли качества).

ТЕМА ДЛЯ РЕФЕРАТИВНОГО СООБЩЕНИЯ

1. Методы и клинико-диагностическое значение определения уровня натрийуретических пептидов при сердечной недостаточности.

Лабораторная работа №1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРДЕЧНОГО ТРОПОНИНА I С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ИММУНОТЕСТА

Принцип исследования

В основе определения сердечного тропонина I лежит принцип одностадийного иммунохроматографического анализа (ИХА).

После добавления исследуемого образца на подушечку для образца, он начинает продвигаться по коньюгатной области и смешивается с Анти-Tn I золотым коньюгатом, который нанесен в зоне конъюгации. Смесь с помощью капиллярных сил продвигается по мембране и реагирует с Анти-Tn I антителами (АТ), нанесенными на мембрану в тестовой зоне.

При достижении пороговой концентрации кардиомаркера, в тестовой области формируется окрашенная полоса. Если образец не содержит кардиомаркер в концентрации выше пороговой, тестовая зона остается бесцветной.

Образец продолжает продвигаться до контрольной зоны и формирует окрашенную в розовый цвет контрольную полосу, свидетельствующую об исправности тест-устройства и правильности результата тестирования.

Материал исследования

Образцы свежей цельной капиллярной крови.

Реактивы

– буфер-разбавитель: 0,9 % раствор натрия хлорида с 0,1 % азидом натрия.

Ход работы

1. Для выполнения анализа рекомендуется использовать готовый диагностический планшет (кассету) для ИХА. Довести температуру образцов крови и тест-устройства до комнатной (18–25 ºС). *Перед началом тестирования внимательно прочитать инструкцию!*
2. Вскрыть упаковку диагностического планшета (кассеты) вдоль прорези, извлечь планшет и положить на сухую чистую горизонтальную поверхность тестовой зоной вверх. Анализ следует провести немедленно после сбора образцов цельной капиллярной крови.
3. Получить образец цельной капиллярной крови: обработать место взятия капиллярной крови (подушечку пальца) асептической салфеткой; с помощью одноразового скарификатора получить каплю капиллярной крови.
4. Внести капиллярную кровь непосредственно с места взятия (подушечки пальца) в окошко для пробы на диагностической кассете: позволить 2 каплям цельной крови из пальца (приблизительно

50 мкл) самостоятельно попасть в окошко для пробы, затем добавить 1 каплю буфера-растворителя (приблизительно 40 мкл) в окошко для пробы поверх крови и включить таймер.

5. Через 5 минут визуально оценить результат реакции. Результат тестирования должен быть интерпретирован в течение 10 минут, но не позднее, чем через 15 минут с начала тестирования.

Интерпретация результатов тестирования

Положительный результат: если в анализируемом образце присутствует сердечный тропонин I в концентрации выше пороговой, то в окошке для чтения результата на тест-полоске (кассете) образуются две параллельные окрашенные линии. Одна линия – в контрольной области, а другая – в тестовой области. Интенсивность окраски тестовой полосы может отличаться от интенсивности окраски контрольной полосы. *Интенсивность окрашивания линии в тестовой области может варьировать в зависимости от концентрации кардиомаркера в пробе. Поэтому любая интенсивность окрашивания линии в тестовой области должна интерпретироваться как положительный результат!*

Отрицательный результат: если в анализируемом образце отсутствует или присутствует тропонин I в концентрации ниже пороговой, в контрольной области появляется только одна окрашенная линия.

Ошибка тестирования: из-за недостаточного объема пробы или неправильной процедуры проведения анализа контрольная линия может не появиться. Необходимо проверить методику выполнения процедуры и повторить анализ с новым тест-набором.

Нормальные показатели

У здорового человека без подозрения на инфаркт миокарда концентрация сердечного тропонина I в цельной крови менее 0,5 нг/мл.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Ответить на вопросы:

1. Какие методы используются для определения уровня натрийуретических пептидов?

2. Как можно интерпретировать результаты иммунохроматографического тестирования крови на миоглобин при подозрении на ИМ?
3. Какой метод лежит в основе экспресс-определения маркеров ранних повреждений миокарда?
4. Почему результат тестирования ИХА должен быть интерпретирован не позднее, чем через 15 минут с начала тестирования?
5. Для чего используется буфер в реакциях ИХА?
6. Какую клинико-диагностическую информацию дает определение в крови уровня сердечных тропонинов?
7. С помощью каких лабораторных методов можно провести количественную оценку содержания в крови кардиомаркеров?

ТЕМА 3.3. ОСНОВЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

ВВЕДЕНИЕ

Углеводы – органические вещества, основными функциями которых являются энергетическая, пластическая, защитная и другие. Обмен углеводов включает целый ряд последовательно протекающих процессов: поступление полисахаридов в организм с пищей, переваривание сложных углеводов в пищеварительном тракте, всасывание моносахаридов в кишечнике, транспорт их и потребление органами и тканями, распад и выделение из организма продуктов обмена.

Глюкоза – необходимый компонент обмена углеводов. Данный моносахарид, поступающий из крови в органы и ткани, подвергается в них различным превращениям, которые приводят к распаду глюкозы с высвобождением потенциальной энергии.

С изменениями уровня глюкозы в крови, прежде всего, связано нарушение регуляции углеводного обмена.

Методы определения концентрации глюкозы в крови и других биологических жидкостях многочисленны: редуктометрические, колориметрические, скрининговые.

Углубленное исследование углеводного обмена производится путем постановки тестов толерантности к глюкозе, а также изучения углеводсодержащих белков и их компонентов в крови.

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмом, принципами и методиками клинико-лабораторной диагностики нарушений углеводного обмена и их значением.

Приобретение практических навыков по определению содержания глюкозы в сыворотке, плазме крови глюкозооксидазным методом, уровня глюкозы капиллярной крови с помощью глюкометра.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Углеводы: определение, биологическая роль в организме человека, классификация.
2. Общий патогенез нарушений углеводного обмена (краткий): нарушение переваривания и всасывания углеводов в пищеварительном тракте; нарушение образования и расщепления гликогена; нарушения промежуточного обмена углеводов; нарушение регуляции углеводного обмена.
3. Патологические изменения концентрации глюкозы в крови (гипо- и гипергликемия), в моче (глюкозурия), их причины и клинико-диагностическое значение.
4. Современное определение и классификация сахарного диабета. Патогенез инсулиновой недостаточности при сахарном диабете типа 1, 2. Особенности сахарного диабета беременных.
5. Критерии и алгоритм диагностики сахарного диабета. Клинические признаки сахарного диабета.
6. Лабораторная диагностика сахарного диабета: оценка концентрации глюкозы в крови, в моче (колориметрический метод (цветная реакция с ортотолуидином)); ферментативные методы (глюкозооксидазный, гексокиназный)). Методология «сухой химии» для экспресс-определения содержания глюкозы в крови, моче и других биологических жидкостях. Правила использования глюкометра.
7. Тесты толерантности к глюкозе: проба с однократной нагрузкой глюкозой, проба с двойной нагрузкой (по Штаубу–Трауготту). Расчет гипергликемического (Бодуэна), постгликемического (Рафальского) коэффициентов.
8. Методы изучения углеводсодержащих белков и их компонентов в крови: гликопротеинов (гаптоглобина в сыворотке крови по методу Каринека и его клинико-диагностическое значение).
9. Осложнения (острые и поздние) сахарного диабета и их лабораторный мониторинг.
10. Принципы и методы определения концентрации гликозилированного (гликированного) гемоглобина (жидкостная хроматография; аффинная хроматография; электрофорез; колоночные методики;

нефелометрический и турбидиметрический анализ; иммунологические методы) и их клинико-диагностическое значение.

11. Инсулинотерапия: понятие об инсулине; свойства болюса («на еду») и фонового инсулина: начало действия, максимальный эффект, общая длительность действия; методы введения инсулина (с помощью шприца, инсулиновой шприц-ручки, инсулиновой помпы).
12. Референтные пределы клинических лабораторных показателей углеводного обмена человека.
13. Возможные источники ошибок исследования углеводного обмена и факторы, влияющие на результат анализа.
14. Процедуры контроля качества исследования глюкозы в крови, моче (внутри- и межлабораторный контроли качества).

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Инсулиновые помпы: понятие, принцип работы, преимущества и недостатки применения, современные разработки.
2. Определение понятия и диагностика метаболического синдрома.

Лабораторная работа №1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ, ПЛАЗМЕ КРОВИ, МОЧЕ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода

Анализ основан на энзиматическом колориметрическом методе исследования без депротеинизации. Глюкозооксидаза катализирует окисление β-D-глюкозы кислородом воздуха с образованием эквимолярных количеств глюколактона и перекиси водорода. Пероксидаза катализирует окисление хромогенных субстратов перекисью водорода в присутствии фенола с образованием окрашенного соединения, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации глюкозы в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 540 (490–540) нм.

Материал исследования

Сыворотка, плазма крови, моча .

Реактивы

– реагент 1 – буфер;

– реагент 2 – лиофилизат (фенол, глюкозооксидаза, пероксидаза, 4-аминоантипирин);
– калибратор – раствор глюкозы 10 ммоль/л.

Ход работы

1. Для проведения анализа рекомендуется использовать готовый набор реагентов. Калибратор готов к применению.
2. Подготовить рабочий реагент: содержимое (лиофилизат) одного флакона с реагентом 2 растворить в содержимом одного флакона с реагентом 1, аккуратно перемешать. Рабочий реагент готов к применению через 2 минуты после растворения.
3. Отобрать необходимые компоненты реакционной смеси с использованием пипеточных дозаторов в объемах, указанных в таблице:

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Рабочий реагент, мл	1,0	1,0	1,0
Сыворотка, плазма крови, моча, мкл	5,0	-	-
Калибратор, мкл	-	5,0	-
Вода бидистиллированная, мкл	-	-	5,0

4. Реакционную смесь тщательно перемешать и инкубировать не менее 15 минут при 18–25°С или 10 минут при 37 °С.
5. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 540 (490–540) нм. *Окраска растворов стабильна не менее 1 часа после инкубации!*
6. Рассчитать концентрацию глюкозы в биологических жидкостях (С, ммоль/л) по формуле:

*С=(Е опытной пробы / Е калибровочной пробы)*10 ммоль/л,*

где *Е опытной пробы* – оптическая плотность исследуемой пробы; *Е калибровочной пробы* – оптическая плотность калибровочной пробы, *10 ммоль/л* – концентрация глюкозы в калибраторе.

Нормальные показатели

У здорового человека содержание глюкозы в сыворотке крови составляет 3,3–5,5 ммоль/л, в плазме – 4,0–6,1 ммоль/л, в моче – 0,06–0,83 ммоль/л.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №2

ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ГЛЮКОЗЫ В КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ГЛЮКОМЕТРА

Принцип метода

Принцип действия глюкометра основан на фотометрическом определении изменения коэффициента отражения аналитической зоны тест-полоски. Кодовая пластинка, входящая в комплект упаковки полосок, содержит необходимую информацию о данном лоте диагностических полосок. При нанесении капли крови на тестовое поле тест-полоски, изменяется коэффициент отражения на аналитической зоне.

С помощью встроенной оптико-электронной системы осуществляется измерение степени этого изменения, пропорционального содержанию глюкозы в крови пациента. Результат измерения отображается на экране встроенного дисплея в ммоль/л и автоматически сохраняется в памяти глюкометра.

Материал исследования

Образцы свежей капиллярной крови.

Ход работы

1. Внимательно прочитать инструкции-вкладышы, которые находятся в упаковках с диагностическими полосками и устройством для прокалывания пальца.
2. Извлечь из контейнера (тубуса) тест-полоску, затем тару следует плотно закрыть фабричной крышкой с осушителем. Полоску следует держать за свободный край пластиковой подложки.
3. Сравнить цвет круглого контрольного окошка, расположенного на обратной стороне тестовой полоски, с цветовой шкалой, напечатанной на контейнере. Цвет контрольного окошка должен совпадать с цветом, которым обозначен интервал на верхней части этикетки (0 ммоль/л / 0 мгл/дл). *Если цвет контрольного окошка отличается от цвета окошка на этикетке флакона, тест-полоски не использовать!*

4. Аккуратно вставить диагностическую полоску в направлении, указанном стрелками в направляющую прибора ACCU-CHEK Active до появления легкого щелчка. При этом необходимо держать полоску таким образом, чтобы стрелки были направлены от себя, а тестовое поле – вверх. *Не сгибать тестовую полоску!*
5. Включить глюкометр и провести стандартное тестирование дисплея в течение 2 секунд (прибор проводит тестирование самостоятельно). После завершения тестирования дисплея на экран выводится номер кода. *Убедиться в том, что номер кода совпадает с номером кода на этикетке тубуса с тест-полосками!*
6. После номера кода на дисплее появляются изображение тест-полоски и мигающее изображение капли, раздается звуковой сигнал. Глюкометр готов к измерению уровня глюкозы крови. *Для нанесения капли крови на тест-полоску отводится около 90 секунд. Затем глюкометр отключается!*
7. Получить образец свежей капиллярной крови: тщательно помыть и протереть насухо палец, из которого планируется взять кровь. С помощью специального устройства для прокалывания кожи или автоматического ланцета проколоть боковую поверхность подушечки пальца. Формированию капли крови можно помочь поглаживанием пальца с легким нажатием в направлении концевой фаланги пальца.
8. Нанести полученную каплю крови в середину зеленого поля тестовой полоски. Как только глюкометр определит, что была нанесена кровь, раздастся звуковой сигнал. Мигающее изображение песочных часов будет означать, что идет измерение.
9. Приблизительно через 5 секунд измерение завершается. На дисплей выводится результат измерения и раздается звуковой сигнал.

Нормальные показатели

У здорового человека содержание глюкозы в капиллярной крови натощак составляет 3,3–5,5 ммоль/л.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Ответить на вопросы:

1. Какие методы используются для определения уровня глюкозы в сыворотке, плазме, капиллярной крови?
2. Для чего предназначены индикаторные полоски Betachek?
3. На чем основан принцип глюкозооксидазного метода определения концентрации глюкозы в крови?
4. От чего зависят нормальные значения содержания глюкозы в моче?
6. Какие альтернативные места прокола для получения капиллярной крови можно использовать при проведении экспресс-исследования на содержание глюкозы?
5. Для чего используется пероксидаза в глюкозооксидазной реакции?
6. Какую клинико-диагностическую информацию дает определение уровня глюкозы в моче, сыворотке, плазме, капиллярной крови?
7. С помощью каких методов можно провести количественную оценку содержания глюкозы в моче?

ТЕМА 3.4. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СИНДРОМА ВОСПАЛЕНИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Воспаление – это эволюционно сформированная реакция живой ткани на повреждение, направленная на обезвреживание повреждающего агента и восстановление ткани. Симптомы воспаления обусловлены экстравазацией плазмы и лейкоцитарной инфильтрацией в очаге повреждения.

Лабораторный синдром воспаления неспецифичен, выраженность его зависит от обширности поражения ткани. Изменения со стороны периферической крови выражаются в лейкоцитозе, сдвиге лейкоцитарной формулы влево, наличием токсической зернистости нейтрофилов, лимфопении, эозинопении, увеличении скорости оседания эритроцитов (СОЭ).

Биохимические признаки воспаления характеризуются повышением содержания в крови α- и γ-глобулинов, сиаловых кислот, серомукоида, фибрина, гаптоглобина, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), особенно фракции $ЛДГ_3$. Как правило, появляется в крови С-реактивный белок (СРБ).

Уровень СРБ быстро и многократно увеличивается при воспалениях различной природы и локализации, паразитарных инфекциях, травмах и опухолях, сопровождающихся воспалением и некрозом тканей. Концентрация СРБ в крови имеет высокую корреляцию с активностью заболевания, стадией процесса.

За последнее десятилетие были разработаны высокочувствительные методы определения СРБ (< 0,5 мг/л). С такой чувствительностью может оцениваться изменение СРБ не только в условиях острого, но также и хронического, низкой степени выраженности эндогенного воспаления.

СРБ – белок острой фазы, самый чувствительный и самый быстрый индикатор повреждения тканей при воспалении, некрозе, травме.

Белки острой фазы воспаления – это специфическая группа белков крови, уровень которых меняется в ответ на развитие острого воспаления. Особенностью большинства белков острой фазы является значительная корреляция уровня в крови с активностью заболевания, стадией процесса. Это выгодно отличает их от других широко используемых маркеров воспаления (СОЭ, количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы). В то же время диагностическая значимость данных тестов, в силу их неспецифичности, может быть ограниченной.

Сегодня белки острой фазы и маркеры воспаления используются для мониторинга течения различных заболеваний и контроля их лечения.

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмом, принципами и методиками исследования лабораторных маркеров воспалительных процессов.

Приобретение практических навыков по определению содержания С-реактивного белка в сыворотке крови методом латекс-агглютинации и исследованию клеток крови с помощью гематологического анализатора.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Понятие о воспалении: основные теории воспаления, этиология воспаления, патогенез воспалительного процесса, общие проявления, течение и исходы, значение для организма.
2. Лабораторная оценка воспалительного процесса: понятие о скорости оседания эритроцитов (СОЭ), фазы процесса оседания эритроцитов, факторы, определяющие СОЭ. Физиологические

вариации СОЭ. Факторы преаналитического этапа исследования, влияющие на определение СОЭ.

3. Определение СОЭ унифицированным микрометодом Панченкова: принцип, реактивы, оборудование, ход анализа, методические условия проведения исследования, недостатки применения метода.
4. Методика определения СОЭ методом Вестергрена (классическим и модифицированным); методом измерения кинетики агрегации эритроцитов (количественная капиллярная фотометрия). Недостатки данных методов.
5. Возможные причины повышения и снижения СОЭ.
6. Понятие о лейкоцитарной формуле, методика подсчета лейкоцитарной формулы. Причины увеличения (нейтрофилез, эозинофилия, базофилия, моноцитоз, лимфоцитоз) и снижения (нейтропения, лимфопения) количества клеток.
7. Лабораторная оценка воспалительного процесса: понятие о белках острой фазы воспаления, их классификация и значение.
8. С-реактивный белок: структура, функции, методы определения в сыворотке крови (иммунотурбидиметрический метод, метод латекс-агглютинации). Ультрачувствительный С-реактивный белок.
9. Кислый α-1-гликопротеин (орозомукоид): структура, функции, методы определения.
10. α-1-Антитрипсин: структура, функции, методы определения.
11. Церулоплазмин: структура, функции, методы определения. Роль определения церулоплазмина в сыворотке крови для диагностики болезни Вильсона-Коновалова.
12. α-2-макроглобулин: структура, функции, методы определения.
13. Амилоидный А белок: структура, функции, методы определения.
14. «Негативные» (отрицательные) реактанты острой фазы воспаления: альбумин, трансферрин, преальбумин.
15. Электрофоретические методы исследования белков острой фазы воспаления: принцип электрофореза, основные требования к приборам и диагностическому процессу, реактивы, ход анализа. Клинико-диагностическое значение исследования протеинограмм для диагностики острых и хронических воспалительных процессов.
16. Референтные показатели лабораторных маркеров воспалительного процесса в организме человека.

17. Возможные источники ошибок оценки синдрома воспаления и факторы, влияющие на результат анализа.
18. Процедуры контроля качества исследования глюкозы в крови, моче (внутри- и межлабораторный контроли качества).

ТЕМА ДЛЯ РЕФЕРАТИВНОГО СООБЩЕНИЯ

1. Автоматические анализаторы для определения скорости оседания эритроцитов.

Лабораторная работа №1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ ЛАТЕКСА

Принцип метода

Латекс-реагент представляет собой суспензию латексных частиц, на поверхности которых иммобилизованы антитела против С-реактивного белка (СРБ) человека. При смешивании данного реагента с сывороткой крови человека, содержащей СРБ в концентрации, превышающей 6,0 мг/л, в результате реакции между антителами к СРБ и антигеном (СРБ) развивается агглютинация латексных частиц. Последняя определяется визуально, что свидетельствует о положительной реакции пробы.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Реагенты

- реагент 1 – СБР-латексный реагент;
- реагент 2 – буфер-разбавитель: 0,9 % раствор натрия хлорида с 0,1 % азидом натрия;
- реагент 3 – положительная контрольная сыворотка с 0,1 % азидом натрия (не менее 12 мг/л СРБ);
- реагент 4 – отрицательная контрольная сыворотка с 0,1 % азидом натрия (менее 6 мг/л СРБ).

Ход работы

1. Для выполнения анализа рекомендуется использовать готовый набор реагентов. Все реагенты готовы к применению.

2. Перед постановкой теста реактивы и анализируемые образцы сыворотки крови необходимо довести до комнатной температуры 18–25 °С.
3. СБР-латексный реагент перед использованием следует перемешать до образования гомогенной суспензии осторожным встряхиванием.
4. *Для качественного определения:* раскапать по 20 мкл в лунки тест-пластины исследуемые образцы и реагенты, используя каждый раз одноразовые наконечники пипеток, следующим образом: в лунки №№ 1-10 – исследуемые образцы сыворотки, в лунку (+) – реагент 3 (положительный контроль), в лунку (–) – реагент 4 (отрицательный контроль).
5. Рядом с первой каплей во все лунки внести по 20 мкл СРБ-латекс суспензии. Смешать содержимое двух капель в лунке до гомогенного состояния, охватывая всю поверхность лунки, ограниченную кольцом. Для каждой лунки использовать одноразовый шпатель или стеклянную палочку.
6. Перемешать содержимое лунок путем вращения тест-пластины вручную или на ротаторе (механической мешалке) со скоростью 80–100 об./мин в течение 2-х минут.
7. Оценить наличие и степень агглютинации в промежутке со 2-ой по 3-ю минуту от момента начала вращения тест-пластины. *Затягивание процесса считывания результата может привести к регистрации ложной агглютинации, возникающей в процессе подсыхания реакционной смеси!*
8. *Для полуколичественного определения:* непосредственно на тест-пластине приготовить разведения исследуемых проб с помощью буфера-разбавителя: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 и 1:64.
9. Легким встряхиванием флакона перемешать СРБ-латексный реагент и добавить по 20 мкл (1 каплю) в каждую ячейку с разведением исследуемого образца, смешать капли.
10. Перемешать содержимое лунок путем вращения тест-пластины вручную или на ротаторе (механической мешалке) со скоростью 80–100 об./мин в течение двух минут.
11. Оценить наличие и степень агглютинации в промежутке со 2-ой по 3-ю минуту от момента начала вращения тест-пластины.

Оценка полученных результатов

Четко видимые агрегаты латексных частиц на прозрачном фоне жидкости свидетельствуют о концентрации СРБ больше 6 мг/л; мелкие агрегаты указывают на концентрацию, близкую к 6 мг/л; равномерно гомогенная молочная суспензия указывает на концентрацию СРБ ниже 6 мг/л – результат отрицательный или ниже предела обнаружения используемого метода.

Для полуколичественного определения СРБ анализируются последовательные разведения исследуемого образца. Об уровне СРБ судят по последнему разведению (титру), при котором была выявлена визуально определяемая агглютинация.

Нормальные показатели

Взрослые – до 6,0 мг/л, дети – до 10 мг/л, новорожденные – до 15,0 мг/л.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №2

АНАЛИЗ КЛЕТОК КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА

Принцип метода

Работа гематологического анализатора основана на принципе проточной цитометрии. Клеточная суспензия попадает в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку. За счет гидродинамического фокусирования клетки выстраиваются друг за другом, и в момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксируют рассеяние света под прямым и малыми углами. Состав и характеристики крови определяют по трем параметрам: электрическому сопротивлению, емкости и светорассеянию.

Материал исследования

Образцы свежей капиллярной крови с антикоагулянтом K_2ЭДТА.

Ход работы

1. Получить образец свежей капиллярной крови из пальца с применением одноразовой системы для взятия капиллярной крови Microvette со встроенным микрокапилляром. Обработать 70 % водным раствором изопропанола внутреннюю поверхность концевой фаланги пальца, осушить поверхность пальца сухой стерильной салфеткой или ватным шариком, с помощью автоматического ланцета быстрым движением произвести прокол кожи. Убрать первые капли крови сухой стерильной салфеткой или ватным шариком. После образования второй капли самотеком полностью заполнить микрокапилляр свежей цельной кровью, стараясь касаться кончиком микрокапилляра только капли крови.
2. Прижать к месту прокола салфетку или ватный шарик с антисептическим раствором. Перевернуть пробирку Microvette в вертикальное положение для самопроизвольного переноса крови из капилляра в пробирку. Удалить крышку с капилляром, снять вторую крышку с основания пробирки, плотно закрыть пробирку. Тщательно перемешать пробу, переворачивая контейнер с кровью. *Пробы, отобранные с помощью микрокапилляра, должны быть проанализированы в течение 10 минут для наиболее точных результатов!* Перед анализом образцы следует тщательно и осторожно перемешать (рекомендуется использовать миксер).
3. Включить питание гематологического анализатора, затем коснуться дисплея для автоматического запуска фонового подсчета. По окончании фонового подсчета результаты отобразятся на экране. Если результаты приемлемы, на главном экране нажать кнопку НОВЫЙ АНАЛИЗ.
4. Поднести пробирку с пробой в область расположения аспирационной иглы (пробозаборника), нажать на пластину, расположенную за иглой для автоматической аспирации пробы. Следовать инструкциям в меню для удаления пробирки с пробой. Разрешение на удаление пробирки дублируется звуковым сигналом.

Необходимо удостовериться, что пробирка с пробой крови не касается верхней части аспирационной иглы. Не убирать пробирку с пробой преждевременно (неполная аспирация может привести к ошибочным результатам) и позже необходимого времени (может привести к ошибке при промывке аспирационной иглы).

5. Распечатать полученные результаты выполненного анализа образца крови.

6. После завершения работы, запустить автоматическую очистку анализатора.

Нормальные показатели

Параметр	Женщины	Мужчины
Эритроциты (RBC)	3,8–5,1 Т/л	4,3–5,7 Т/л
Гемоглобин (HGB)	117–160 г/л	131–173 г/л
Гематокрит (HCT)	35–45 %	39–50 %
MCV	80–100 фл	80–100 фл
MCH	27–34 пг	27–34 пг
MCHC	32–36 г/дл	32–37 г/дл
RDW	11,6–14,8 %	11,6–14,8 %
Тромбоциты (PLT)	150–400 Г/л	150–400 Г/л
Лейкоциты (WBC)	3,5–11,0 Г/л	4,9–10,5 Г/л

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, нормальные показатели, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Ответить на вопросы:

1. Какие методы используются для определения С-реактивного белка в крови?
2. Для чего предназначены черные кольца на тест-пластинах для определения С-реактивного белка в реакции агглютинации латекса?
3. На чем основано определение уровня С-реактивного белка методом агглютинации?
4. От чего зависят нормальные значения СРБ в крови?
5. Каким способом проводят полуколичественную оценку содержания СРБ в крови?

6. Для чего используется латексный реагент в методике агглютинации для определения СРБ в сыворотке крови?
7. Какую клинико-диагностическую информацию дает определение уровня СРБ в крови?
8. С помощью каких методов можно провести количественную оценку содержания СРБ в крови?

РАЗДЕЛ 4

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА НЕОТЛОЖНЫХ СОСТОЯНИЙ

ТЕМА 4.1. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА НЕОТЛОЖНЫХ СОСТОЯНИЙ: АЛГОРИТМЫ, МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОГО АНАЛИЗА НАРУШЕНИЙ ВОДНО-ЭЛЕКТРОЛИТНОГО ОБМЕНА И КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СОСТОЯНИЯ (СЕМИНАР)

ВВЕДЕНИЕ

Одна из наиболее важных задач лабораторной медицины – диагностика неотложных состояний.

Любое вмешательство в организм человека в той или иной степени приводит к нарушению гомеостаза в организме. Неотложные состояния – это крайняя степень любой патологии, при которой требуется интенсивная медикаментозная поддержка жизненно важных функций организма или их искусственное замещение. Данными патологиями являются полиорганная и дыхательная недостаточности, сепсис, шок, кома, инфаркт миокарда, тяжелые осложнения при сердечно-сосудистых заболеваниях, болезнях печени, почек, сахарном диабете.

Основной задачей лабораторной диагностики неотложных состояний является выполнение срочных и объективных исследований, результаты которых необходимы для постановки диагноза в экстренной ситуации для оценки степени тяжести состояния больного и медикаментозной коррекции.

Решение этой задачи в большинстве лечебных учреждений возложено на лабораторию экспресс-диагностики. Для успешного оказания реанимационной помощи время выполнения лабораторных исследований по жизненным показаниям не должно превышать трех-пяти минут. К таким исследованиям относятся определение газов крови, определение гемоглобина, гематокрита, объема циркулирующей крови, уровня глюкозы крови, электролитов (калий, натрий, хлориды), лактата, показателей кислотно-основного состояния (КОС) крови.

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмами, принципами и методиками исследования показателей водно-электролитного обмена и кислотно-основного состояния при неотложных и экстренных состояниях.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Понятие о неотложных и экстренных состояниях. Специфика неотложных состояний. Классификация неотложных состояний.
2. Система помощи при неотложных состояниях. Задачи лабораторной диагностики неотложных и экстренных состояний. Порядок организации проведения и требования к временным параметрам выполнения неотложных и экстренных лабораторных исследований.
3. Сложности в организации лабораторных исследований для больных с неотложными состояниями.
4. Концепция выполнения лабораторных исследований «point of care testing – POCT» – «анализ по месту оказания медицинской помощи».
5. Перечень лабораторных исследований, выполняемых лабораторией экспресс-диагностики (общеклинические, биохимические, изосерологические методы, анализ системы гемостаза, определение концентрации лекарственных препаратов и пр.). Структура анализов в экспресс-лаборатории. Наиболее распространенные неотложные исследования в плановой КДЛ.
6. Примерный перечень оборудования для лаборатории экспресс-диагностики.
7. Различия в диагностике неотложных состояний у детей и взрослых.
8. Нарушения водного обмена (дисгидрии): общее обезвоживание; внеклеточная и клеточная дегидратации; общая, внеклеточная и клеточная гипергидратации.
9. Методы определения и клинико-диагностическое значение определения калия и натрия в крови (гипо- и гиперкалиемия, гипо- и гипернатриемия (относительная и абсолютная)).
10. Методы определения уровня общего кальция в сыворотке (плазме) крови фотометрическим методом; методом, основанным на реакции с глиоксаль-бис-(2-оксианилом).

11. Клинико-диагностическое значение определения кальция в крови (физиологическая и патологическая гиперкальциемия, гипокальциемия).
12. Лабораторные методы определения магния в крови. Клинико-диагностическое значение определения магния (гипо- и гипермагниемия).
13. Определение содержания ионов хлора в сыворотке крови, моче и спинномозговой жидкости меркуриметрическим методом с индикатором дифенилкарбазоном.
14. Клинико-диагностическое значение определения хлорид-ионов в биологических жидкостях (гипо- и гиперхлоремия).
15. Методы и клинико-диагностическое значение определения уровня неорганического фосфора в сыворотке крови и моче.
16. Исследование уровня железа сыворотки крови. Батофенантролиновый метод определения содержания железа в сыворотке крови.
17. Определение общей и ненасыщенной железосвязывающей способности сыворотки крови.
18. Клинико-диагностическое значение определения уровня железа и железосвязывающей способности сыворотки крови.
19. Диагностика острого и хронического дыхательного ацидоза: клинические проявления, диагностические тесты.
20. Диагностика острого и хронического дыхательного алкалоза: клинические проявления, диагностические тесты.
21. Диагностика острого и хронического метаболического ацидоза: клинические проявления, диагностические тесты.
22. Диагностика острого и хронического метаболического алкалоза: клинические проявления, диагностические тесты.

РАЗДЕЛ 5

АЛГОРИТМЫ И СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ОРГАННЫХ ПАТОЛОГИЯХ

ТЕМА 5.1. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЧЕК

ВВЕДЕНИЕ

Основными функциями почек являются выделительная (удаление конечных продуктов обмена веществ), гомеостатическая (сохранение постоянства внутренней среды организма), внутрисекреторная и регуляторная (участие в контроле уровня артериального давления и эритропоэза).

При поражении почек изучение их функционального состояния может служить как для диагностических целей (особенно при раздельном изучении функций почек), так и для прогностического контроля, поскольку позволяет оценивать динамику заболевания.

Нарушения почечных функций обычно возникают незаметно. Изменения в лабораторных показателях появляются намного раньше первых клинических симптомов.

Существует несколько клинико-лабораторных симптомокомплексов при заболеваниях почек, которые позволяют дифференцировать патофизиологические механизмы нарушения почечных функций.

Патология экскреторной функции почек проявляется повышением содержания мочевины в крови, метаболическим ацидозом, изменением соотношения электролитов.

Нарушение процессов реабсорбции приводит к избыточной потери жидкости, утрате ионов натрия, калия, фосфатов, бикарбонатов.

Изменения секреторной функции преимущественно при генных патологиях почек становятся причиной фосфатурии, бикарбонатурии, почечного тубулярного ацидоза.

При поражении сосудов вследствие гипертонии, атеросклероза и/или сахарного диабета почки не способны адекватно фильтровать

кровь. Повреждения почечных клубочков при аутоиммунной патологии, последствиях стрептококковой инфекции приводят к нарушению процессов фильтрации и избыточному поступлению в мочу из крови белков, глюкозы и форменных элементов, количество которых, в свою очередь, изменяется в кровяном русле.

При повреждении клубочкового аппарата почек – гломерулонефрите – в анализах мочи выявляют по эритроцитурия, лейкоцитурия, протеинурия, в крови изменяется содержание электролитов. Тяжелая патология почек, сопровождающаяся массивной потерей белка с мочой, уменьшением количества белка в моче и отеками, описывается как нефротический синдром.

Хронический гломерулонефрит и пиелонефрит нередко приводят к хронической болезни почек и прогрессирующей почечной недостаточности. При этом в крови увеличивается содержание креатинина, мочевины, калия, возрастает потеря с мочой натрия, белка, нарушается регуляция артериального давления и кроветворения, развивается анемия.

Возбудители инфекций могут попасть в почки как гематогенным, так и восходящим путем от мочевого пузыря при наличии цистита и стать причиной воспаления лоханки и паренхимы почек с развитием пиелонефрита, тубуло-интерстициального нефрита. При этом в лабораторных анализах обнаруживаются признаки острого воспаления – в крови и моче увеличивается число лейкоцитов, появляется бактериурия.

Поражение почек также возникает при наличии преграды на пути оттока мочи, например, при мочекаменной болезни, опухолях, пережатии мочеточника во время беременности, увеличении простаты. В крови увеличивается содержание креатинина, мочевины, изменяется содержание электролитов, что, в свою очередь, становится причиной нарушения функций других органов и систем.

Ввиду многообразия причин заболеваний почек необходимо комплексное обследование пациента с учетом клинических данных, результатов лабораторных и инструментальных методов исследования.

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмом, принципами, методиками и современными лабораторными технологиями диагностики заболеваний почек.

Приобретение практических навыков по определению концентраций креатинина и мочевины в сыворотке крови и суточной моче.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Краткая характеристика и распространенность отдельных синдромов поражений почек: мочевого, нефротического, гипертонического, острой и хронической почечной недостаточностей (ОПН, ХПН), синдрома канальцевой дисфункции.
2. Основные лабораторные проявления поражения почек. Алгоритм лабораторного выявления ведущих синдромов поражения почек.
3. Лабораторные методы оценки функционального состояния почек: методы, основанные на исследовании очистительной функции почки (клиренс, его виды и технология определения); методы определения концентрации мочевины и креатинина в сыворотке крови и моче (оценка функциональной способности клубочков и канальцев почек).
4. Алгоритм проведения пробы по С.С. Зимницкому, исследования по А.З. Нечипоренко, стаканных проб и их клинико-диагностическое значение.
5. Лабораторная диагностика протеинурии. Маркерные белки типирования протеинурии. Метод определения парапротеинов (реакция Бенс–Джонса). Методы исследования микроальбуминурии и клиническая значимость ее выявления.
6. Клинико-диагностическое значение исследования углеводов в моче. Определение понятия «почечного порога» глюкозы.
7. Клинико-диагностическое значение исследования в моче метаболитов пигментного обмена (билирубина, уробилина).
8. Принципы лабораторной диагностики пиурии (лейкоцитурии, бактериурии).
9. Клинико-диагностическое значение основных почечных (мочевых) синдромов и элементов мочевого осадка.
10. Цели и методики проведения бактериологического исследования мочи.
11. Референтные пределы лабораторных показателей заболеваний почек.
12. Возможные источники ошибок исследования лабораторных показателей заболеваний почек и факторы, влияющие на результат анализа.
13. Процедуры контроля качества исследования показателей почечных патологий (внутри- и межлабораторный контроли качества).

ТЕМЫ ДЛЯ РЕФЕРАТИВНЫХ СООБЩЕНИЙ

1. Прижизненная пункционная нефробиопсия и ее роль в диагностике заболеваний почек.
2. Эффективный способ первичного скрининга инфекций мочевыводящих путей – технология «Dipstreak» («Дипстрик»).

Лабораторная работа №1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КРЕАТИНИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И СУТОЧНОЙ МОЧЕ

Принцип метода

Метод основан на реакции Яффе. Креатинин в щелочной среде взаимодействует с пикриновой кислотой с образованием окрашенного комплекса, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации креатинина в образце и измеряется фотометрически при длине волны 505 (490–520) нм.

Материал исследования

Сыворотка крови; свежая моча, разведенная в 100 раз дистиллированной водой.

Реагенты

– реагент 1 – пикриновая кислота;
– реагент 2 – натр едкий;
– реагент 3 – депротеинизатор;
– калибратор – раствор креатинина 177 мкмоль/л.

Ход работы

1. Для выполнения анализа рекомендуется использовать готовый набор реагентов. Все реагенты готовы к применению.

Подготовка к анализу

Составные части проб	Опытная проба	Контрольная проба
Сыворотка, разведенная моча, мл	0,5	-
Вода дистиллированная, мл	1,0	1,5
Реагент 3, мл	0,5	0,5

2. Тщательно перемешать содержимое пробирок опытных проб и через 10 минут центрифугировать при 900g в течение 15 минут. Для дальнейшего анализа использовать прозрачную надосадочную жидкость (супернатант). Содержимое пробирки контрольной пробы перемешать.

Проведение анализа

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Супернатант, мл	1,0	-	-
Калибратор, мл	-	1,0	-
Контрольный раствор, мл	-	-	1,0
Реагент 2, мл	0,5	0,5	0,5
Реагент 1, мл	0,5	0,5	0,5

3. Содержимое пробирок тщательно перемешать после добавления каждого реагента и инкубировать при температуре 18–25 ºС ровно 20 минут.
4. Измерить оптические плотности опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 505 (490–520) нм.
5. Рассчитать концентрацию креатинина в сыворотке крови и разведенной моче, используя формулы:

Содержание креатинина в сыворотке крови:

*С=(Е опытной пробы / Е калибровочной пробы)*177 мкмоль/л*

Содержание креатинина в моче:

*С=(Е опытной пробы / Е калибровочной пробы)*100*(177 / 1000)*
или
*С=(Е опытной пробы / Е калибровочной пробы)*17,7 ммоль/л*V,*

где *Е опытной пробы* – оптическая плотность исследуемой пробы; *Е калибровочной пробы* – оптическая плотность калибровочной пробы, *177 мкмоль/л* – концентрация креатинина в калибраторе, *100* – разведение мочи, *1000* – перевод в ммоль, *V* – объем суточной мочи, л.

Нормальные показатели

Содержание креатинина в сыворотке крови у женщин – 53–97 мкмоль/л, у мужчин – 61–115 мкмоль/л. Содержание креатинина в суточной моче – 4,4–17,7 ммоль/сутки.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И СУТОЧНОЙ МОЧЕ

Принцип метода

Анализ основан на уреазном фенол-гипохлоритном методе. Мочевина под действием уреазы гидролизуется с образованием углекислого газа и аммиака, содержание которого определяется колориметрически по образованию окрашенных продуктов с гипохлоритом и фенолом. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации мочевины в образце и измеряется фотометрически при длине волны 505 (490–520) нм.

Материал исследования

Негемолизированная сыворотка; моча, разведенная дистиллированной водой в 100 раз.

Реагенты

- реагент 1 – стабилизированный раствор уреазы;
- реагент 2 – фенол/нитропруссидный реагент;
- реагент 3 – гипохлорит натрия;
- калибратор – раствор мочевины 5 ммоль/л (30 мг/100 мл).

Ход работы

1. Для выполнения анализа рекомендуется использовать готовый набор реагентов. Все реагенты готовы к применению.

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Реагент 1, мкл	100	100	100
Исследуемый образец, мкл	10	-	-
Калибратор, мкл	-	10	-
Вода дистиллированная, мкл	-	-	10

2. Реакционную смесь перемешать и инкубировать не менее 5 минут при температуре 18–25 °С или не менее 3 минут при 37 °С.
3. После окончания инкубации во все пробы внести по 1 мл реагента 2 и по 1 мл реагента 3. Инкубировать пробы не менее 20 минут при 37 °С.
4. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 540 (520–560) нм. *Окраска раствора стабильна в течение часа после инкубации!*
5. Рассчитать концентрацию мочевины в сыворотке крови и разведенной моче, используя формулы:

Содержание мочевины в сыворотке крови:

$$C=(E \text{ опытной пробы} / E \text{ калибровочной пробы})*5 \text{ ммоль/л}$$

Содержание мочевины в моче:

$$C=(E \text{ опытной пробы} / E \text{ калибровочной пробы})*5*100*V,$$

где *Е опытной пробы* – оптическая плотность исследуемой пробы; *Е калибровочной пробы* – оптическая плотность калибровочной пробы, *5 ммоль/л* – концентрация мочевины в калибраторе, *100* – разведение мочи, *V* – объем суточной мочи, л.

Нормальные показатели

Содержание мочевины в сыворотке крови – 2,5–8,3 ммоль/л, в суточной моче – 330–580 ммоль/сутки.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Ответить на вопросы:

1. Какие методы используются для определения концентрации мочевины, креатинина в сыворотке крови, суточной моче?
2. На чем основан уреазный фенол-гипохлоритный метод определения уровня мочевины в биологических жидкостях?
3. Какая реакция лежит в основе унифицированной методики определения концентрации креатинина в сыворотке крови, суточной моче?
4. Почему различаются нормальные значения концентрации креатинина в сыворотке крови у женщин и мужчин?
5. Как рассчитывают креатининовый клиренс?
6. Для чего используют гипохлорит натрия в методике уреазного фенол-гипохлоритного метода определения концентрации мочевины в сыворотке крови, суточной моче?
7. Какую клинико-диагностическую информацию дает определение уровня креатинина, мочевины в сыворотке крови, суточной моче?
8. Чем и как разводят суточную мочу перед исследованием в ней уровня креатинина, мочевины?

ТЕМА 5.2. АЛГОРИТМЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ

ВВЕДЕНИЕ

Печень – самая крупная железа в организме человека. Этот орган выполняет разнообразные функции, основными из которых являются синтез белков, в том числе альбуминов, глобулинов и белков свертывающей системы крови, метаболизм гормонов, детоксикация вредных веществ и продуктов обмена, синтез холестерина и глюкозы, запасание витаминов, железа и многие другие.

Заболевания печени могут иметь разную этиологию (наследственные нарушения метаболизма, интоксикация, сахарный диабет, вирусная инфекция, аутоиммунные патологии) и очень распространены среди населения.

Ведущую роль в оценке состояния печени играет лабораторная диагностика. Традиционно выявление патологий данного органа – комплексное исследование, включающее анализ многих лабораторных маркеров заболеваний печени.

Для оценки синтетической функции печени исследуют концентрации следующих лабораторных показателей: альбумина, факторов свертывания крови, общего холестерина.

При заболеваниях, сопровождающихся нарушением целостности гепатоцитов, печеночные внутриклеточные ферменты высвобождаются в кровь, и их концентрация в ней возрастает. Этот лабораторный феномен называется синдромом цитолиза. В клинической практике для диагностики цитолиза исследуют активность печеночных ферментов АЛТ и АСТ – трансаминаз, катализирующих перенос аминогрупп между аминокислотами.

Для исключения обструкции желчных путей желчными камнями или опухолью исследуют общую концентрацию билирубина и его фракций, активность щелочной фосфатазы и γ-глутамилтранспептидазы.

Билирубин – пигмент, образующийся при распаде гемоглобина и некоторых других гемсодержащих белков в печени, селезенке и костном мозге. Он проявляет токсичность в отношении нервной системы и должен удаляться из организма с желчью или с мочой. Экскреция билирубина – многоступенчатый процесс, в котором печень играет основную роль. Различают две основные фракции билирубина: прямую и непрямую.

При связывании билирубина с глюкуроновой кислотой в печени образуется связанный билирубин. Так как этот вид билирубина можно определить напрямую, с помощью непосредственного лабораторного теста, он также называется прямым билирубином. Билирубин, который не подвергся конъюгации с глюкуроновой кислотой, называется несвязанным (непрямым).

В лабораторных условиях концентрацию непрямого билирубина рассчитывают, исходя из концентраций общего и связанного билирубинов. Общий билирубин состоит из обеих фракций.

Увеличение уровня билирубина может наблюдаться при многих заболеваниях печени, однако наибольшее значение этого маркера заключается в дифференциальной диагностике желтух. Для гемолитической (надпеченочной) желтухи характерно увеличение общего и непрямого билирубина. Для печеночной желтухи типично повышение обеих фракций (прямого и непрямого билирубина) и общего билирубина. Для обструктивной (подпеченочной) желтухи характерно увеличение общего и прямого билирубинов.

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмом, принципами, методиками и современными лабораторными технологиями диагностики печеночных патологий.

Приобретение практических навыков по определению концентраций общего и прямого билирубинов в сыворотке крови.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Общие признаки печеночных патологий. Печеночные синдромы, их характеристика: клинические проявления и лабораторные показатели.
2. Алгоритмы и методы лабораторного обследования пациентов при классических вирусных гепатитах.
3. Алгоритмы и методы лабораторного обследования пациентов при гепатитах при системных вирусных инфекциях.
4. Алгоритмы и методы лабораторного обследования пациентов при аутоиммунных заболеваниях печени.
5. Алгоритмы и методы лабораторного обследования пациентов при заболеваниях печени при бактериальных или паразитарных инфекциях.
6. Алгоритмы и методы лабораторного обследования пациентов при генетически обусловленных метаболических нарушениях.
7. Биохимическая дифференциальная диагностика желтух. Физиологическая желтуха новорожденных. Методы определения билирубина и его фракций в сыворотке крови.
8. Референтные интервалы лабораторных маркеров печеночных патологий.
9. Клинико-диагностическое значение исследования лабораторных показателей заболеваний печени.
10. Возможные источники ошибок исследования лабораторных показателей патологии печени и факторы, влияющие на результат анализа.
11. Процедуры контроля качества биохимического исследования показателей пигментного обмена (внутри- и межлабораторный контроли качества).

ТЕМА ДЛЯ РЕФЕРАТИВНОГО СООБЩЕНИЯ

1. Диагностика стадии фиброза и оценка степени поражения печени с помощью методики фибросканирования.

Лабораторная работа №1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ОБЩЕГО И ПРЯМОГО БИЛИРУБИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода

Определение основано на методе Йендрашека–Грофа. Прямой (связанный, конъюгированный с глюкуроновой кислотой) билирубин непосредственно реагирует с диазотированной сульфаниловой кислотой, а общий билирубин определяется в присутствии кофеинового реагента с образованием окрашенного азосоединения. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации билирубина и измеряется фотометрически при длине волны 535 (500–560) нм.

Материал исследования

Сыворотка крови без следов гемолиза.

Реактивы:

– реагент 1 – кофеиновый реагент;
– реагент 2 – сульфаниловая кислота;
– реагент 3 – натрия нитрит;
– реагент 4 – физиологический раствор;
– калибратор – раствор билирубина 85,5 мкмоль/л (в 2 мл дистиллированной воды).

Ход работы

1. Для выполнения анализа рекомендуется использовать готовый набор реагентов.

Подготовка к анализу

2. Для исследования приготовить рабочий раствор диазореагента: смешать необходимые количества реагентов 2 и 3 в соотношении 40:1. Диазореагент стабилен не менее 10 дней при температуре 2–8 °С в плотно закрытой посуде из темного стекла.
3. Приготовить рабочий раствор калибратора: содержимое флакона с калибратором растворить в 2 мл дистиллированной воды. После полного растворения концентрация билирубина составляет 85,5 мкмоль/л. Растворенный калибратор стабилен в течение 5 дней при температуре 2–8 °С в защищенном от света месте.

Проведение анализа

Компоненты реакционной среды	Опытная проба		Контрольная проба	Калибровочная проба
	Общий билирубин	Прямой билирубин		
Сыворотка, мл	0,2	0,2	0,2	-
Реагент 1, мл	1,4	-	-	1,4
Реагент 4, мл	0,2	1,4	1,8	0,2
Калибратор, мл	-	-	-	0,2
Диазореагент, мл	0,2	0,2	-	0,2

4. Пробы тщательно перемешать!
5. Для определения прямого билирубина точно через 5 минут (при комнатной температуре) измерить величину экстинкции опытной пробы против соответствующей контрольной пробы при длине волны 535 (500–560) нм.
6. Для определения общего билирубина через 20 минут (при комнатной температуре) измерить величину экстинкции опытной пробы против соответствующей контрольной пробы при длине волны 535 (500–560) нм. *Интенсивность окраски стабильна не менее 1 часа в защищенном от света месте!*
7. Экстинкцию калибратора измерить против дистиллированной воды через 20 минут (при комнатной температуре) при длине волны 535 (500–560) нм.
8. Рассчитать концентрацию общего и прямого билирубина в сыворотке крови, используя формулу:

*С=(Е опытной пробы / Е калибровочной пробы)*85,5 мкмоль/л,*

где *Е опытной пробы* – оптическая плотность исследуемой пробы; *Е калибровочной пробы* – оптическая плотность калибровочной пробы, *85,5 мкмоль/л* – концентрация билирубина в калибраторе.

Нормальные показатели

Содержание общего билирубина в сыворотке крови – 5,1–20,5 мкмоль/л, прямого билирубина в сыворотке крови – до 4,2 мкмоль/л.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Ответить на вопросы:

1. Какие методы используются для определения концентрации общего и прямого билирубинов в сыворотке крови?
2. На чем основан метод Йендрашека–Грофа?
3. Какая реакция лежит в основе методики определения концентрации общего и прямого билирубинов в сыворотке крови?
4. Для чего используют кофеиновый реагент в методике определения концентрации общего билирубина в сыворотке крови по реакции Йендрашека–Грофа?
5. Какую клинико-диагностическую информацию дает определение концентраций общего и прямого билирубинов в сыворотке крови?
6. Определение каких лабораторных показателей проводят при биохимической дифференциальной диагностике желтух?
7. Через какие временные промежутки необходимо измерять величину экстинкции опытной пробы прямого, общего билирубина против соответствующей контрольной пробы в методе по реакции Йендрашека–Грофа?

ТЕМА 5.3. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ВВЕДЕНИЕ

Поджелудочная железа (ПЖ) – орган желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), расположенный позади желудка и выполняющий важные экзо- и эндокринные функции.

Благодаря синтезу и секреции ферментов пищеварения внешнесекреторной частью ПЖ осуществляется переваривание белков и жиров в тонкой кишке. Кроме протео- и липолитических ферментов она выделяет бикарбонаты, нейтрализуя соляную кислоту желудочного сока в двенадцатиперстной кишке (ДПК).

Патология ПЖ, в первую очередь, приводит к нарушению пищеварения, а при хронических заболеваниях способствует развитию эндокринных нарушений. Хронические заболевания ПЖ приводят к панкреатической недостаточности, потере веса, развитию асцита из-за

нарушения переваривания и всасывания питательных веществ из кишечника.

Повышение в крови активности ферментов ПЖ (α-амилазы и липазы) и уровня С-реактивного белка – признаки активного воспаления органа – острого панкреатита. Изменение уровня глюкозы и С-пептида указывает на нарушение эндокринной функции ПЖ и является косвенным признаком повреждения панкреатической островковой ткани, которое может возникнуть при хроническом панкреатите.

Цель большинства лабораторных исследований патологии ПЖ – выявление повреждения, цитолиза ацинарных клеток: определение содержания (активности) панкреатических ферментов в крови и моче; оценка степени тяжести, прогноза панкреатита: оценка маркеров активности воспаления. Часть представляет собой тесты для определения этиологии панкреатита.

К группе функциональных тестов относятся методы оценки внешнесекреторной функции ПЖ: определение содержания (активности) панкреатических ферментов или продуктов гидролиза субстратов в соке ПЖ, дуоденальном содержимом, кале, моче, выдыхаемом воздухе; а также исследования эндокринной функции ПЖ: определение уровня глюкозы, гормонов, панкреатического полипептида в крови.

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмом, принципами, методиками и современными лабораторными технологиями диагностики заболеваний поджелудочной железы.

Приобретение практических навыков по определению активностей ферментов аланинаминотрансферазы в сыворотке крови и α-амилазы в крови и моче.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Ключевые особенности (сложности) диагностики заболеваний поджелудочной железы.
2. Выявление повреждения, цитолиза ацинарных клеток: определение содержания (активности) панкреатических ферментов в крови и моче.
3. Оценка степени тяжести, прогноза панкреатита (развитие панкреонекроза, инфицирование, вероятности осложнений и летального исхода): маркеры активности воспаления.
4. Методы лабораторного определения этиологии панкреатита.

5. Функциональные тесты для оценки внешнесекреторной функции поджелудочной железы (определение содержания (активности) панкреатических ферментов или продуктов гидролиза субстратов в соке поджелудочной железы, в дуоденальном содержимом, в кале, моче, выдыхаемом воздухе); эндокринной функции поджелудочной железы: определение уровня глюкозы, гормонов, панкреатического полипептида в крови.
6. Исследование специфических онкомаркеров при опухолях поджелудочной железы.
7. Клинико-диагностическое значение исследования лабораторных показателей заболеваний поджелудочной железы.
8. Возможные источники ошибок исследования лабораторных показателей патологии поджелудочной железы и факторы, влияющие на результат анализа.
9. Процедуры контроля качества биохимического исследования показателей нарушения функции поджелудочной железы (внутри- и межлабораторный контроли качества).

Лабораторная работа №1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода

В основе исследования – метод Райтмана–Френкеля. Под действием фермента аланинаминотрансферазы (АЛТ) в результате переаминирования происходит перенос аминогруппы с аланина на α-кетоглутарат. Активность АЛТ пропорциональна количеству образовавшихся динитрофенилгидразонов пирувата в щелочной среде, которое определяется фотометрически при длине волны 537 (500–560) нм.

Материал исследования

Сыворотка крови без следов гемолиза.

Реагенты

– реагент 1 – буфер-субстратный раствор: L-аланин, α-кетоглутаровая кислота;
– реагент 2 – раствор 2,4-динитрофенилгидразина;
– реагент 3 – натрий едкий;
– калибратор – раствор пирувата натрия 1,0 ммоль/л.

Ход работы

1. Для выполнения анализа рекомендуется использовать готовый набор реагентов. Реагенты 1, 2 и калибратор готовы к применению. Содержимое флакона реагента 3 (или аликвоту) следует развести бидистиллированной водой в 10 раз; хранить в полиэтиленовой таре.

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Калибровочная проба
Реагент 1, мл	0,25	0,25
Сыворотка, мкл	50	-
Инкубировать при температуре 37 °С в течение 30 минут		
Реагент 2, мл	0,25	0,25
Сыворотка, мкл	-	50
Перемешать, инкубировать при температуре 18–25°С в течение 20 минут		
Рабочий реагент 3, мл	2,5	2,5
Перемешать, инкубировать при температуре 18–25 °С в течение 10 минут		

2. Измерить оптические плотности опытных и соответствующих контрольных проб против дистиллированной воды при длине волны 537 (500–560) нм. *Интенсивность окраски стабильна не менее часа в защищенном от света месте!*
3. Рассчитать активность АЛТ в сыворотке крови. Активность АЛТ выражается в единицах, которые определяются количеством образовавшегося пирувата (ммоль или мкмоль) за единицу времени (час или секунда) в единице объема (литр) биологической жидкости. Расчет активности (А) фермента произвести по формуле:

$$A = (E \text{ опытной пробы} - E \text{ калибровочной пробы}) * K,$$

где *Е опытной пробы* – оптическая плотность исследуемой пробы; *Е калибровочной пробы* – оптическая плотность калибровочной пробы, *К* – коэффициент, рассчитанный по калибровочному графику.

Примечание: при активности фермента, превышающей 4 ммоль/(ч*л) или 1,112 мкмоль/(с*л), сыворотку крови рекомендуется

развести физиологическим раствором и учесть степень разведения при расчете.

4. Используя данные таблицы приготовить серию калибровочных проб:

№	Калибратор	Дис. вода	Реагент 2	Активность АЛТ	
	мл			мкмоль/(с*л)	ммоль/(ч*л)
1	0,050	0,550	0,50	0,278	1,0
2	0,100	0,500	0,50	0,556	2,0
3	0,150	0,450	0,50	0,834	3,0
4	0,200	0,400	0,50	1,112	4,0
5	0,250	0,350	0,50	1,390	5,0
6	0,300	0,300	0,50	1,668	6,0
контроль	-	0,600	0,50	-	-
После добавления реагента 2 перемешать и инкубировать при температуре 18–25 °С в течение 20 минут.					

5. Во все пробирки внести по 5,0 мл разведенного реагента 3, перемешать реакционную смесь и через 10 минут (18–25 °С) измерить оптические плотности калибровочных растворов против контроля при длине волны 537 (500–560) нм.
6. Построить график зависимости оптической плотности от активности фермента.
7. По калибровочному графику рассчитать коэффициент *К:*

$$K = A / E,$$

где *А* – активность фермента из таблицы, *Е* – экстинкция соответствующей калибровочной пробы.

Нормальные показатели

Активность АЛТ в сыворотке крови – до 0,19 мкмоль/(с*л) или до 0,68 ммоль/(час*л).

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Лабораторная работа №2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ α-АМИЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ

Принцип метода

В основе исследования – метод Каравея. Под действием α-амилазы крахмал гидролизуется с образованием продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. Интенсивность уменьшения окраски йодкрахмального комплекса в единицу времени пропорциональна активности фермента.

Материал исследования

Сыворотка крови без следов гемолиза; моча, разведенная дистиллированной водой в 10 раз.

Реагенты

- реагент 1 – буфер;
- реагент 2 – субстрат – крахмал по Lintner 10 мг/мл;
- реагент 3 – концентрированный раствор йода;
- реагент 4 – раствор фторида калия;
- реагент 5 – кислота соляная.

Ход работы

1. Для выполнения анализа рекомендуется использовать готовый набор реагентов.
2. Приготовить рабочий раствор субстрата: смешать необходимые количества реагентов 1 и 2 в соотношении 24:1. Рабочий раствор субстрата стабилен в течение 5-ти дней при температуре 2–8 °С.
3. Приготовить рабочий раствор йода: смешать необходимые количества реагентов 3 и 4 с дистиллированной водой в соотношении 1:2:7. Рабочий раствор йода стабилен не менее месяца при температуре 18–25 °С при хранении в защищенном от света месте.
4. Приготовить рабочий раствор соляной кислоты: развести необходимое количество реагента 5 дистиллированной водой в соотношении 1:15. Рабочий раствор соляной кислоты стабилен длительное время.
5. Подготовить пробы следующего состава:

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Калибровочная проба
Рабочий раствор субстрата, мл	0,50	0,50
Инкубировать при температуре 37 °С в течение 5 минут		
Сыворотка, моча, мкл	10	-
Перемешать, инкубировать при температуре 37 °С в течение 5 минут		
Рабочий раствор соляной кислоты, мл	4,0	4,0
Сыворотка, моча, мкл	-	10
Рабочий раствор йода, мл	0,3	0,3
Перемешать, инкубировать при температуре 18–25 °С в течение 5 минут		

6. Измерить оптические плотности опытных и соответствующих контрольных проб против дистиллированной воды при длине волны 630 (630–690) нм. *Интенсивность окраски стабильна не менее часа после инкубации!*
7. Рассчитать активность α-амилазы в сыворотке крови и моче. Активность выражается в единицах, которые определяются количеством крахмала (мг), гидролизованного одним литром исследуемой биологической жидкости за одну секунду при температуре 37°С (мг/сек*л). Расчет активности (А) фермента провести по формуле:

$$A = ((E \text{ контрольной пробы} - E \text{ опытной пробы}) / E \text{ контрольной пробы}) * c * t * K$$

или

$$A = ((E \text{ контрольной пробы} - E \text{ опытной пробы}) / E \text{ контрольной пробы}) * 66,6$$

где *Е опытной пробы* – оптическая плотность исследуемой пробы; *Е контрольной пробы* – оптическая плотность контрольной пробы, *С* – коэффициент пересчета на 1 мг крахмала, *t* – коэффициент пересчета на 1 секунду инкубации, *К* – коэффициент пересчета на 1 л биологической жидкости, *66,6* – при соблюдении приведенных в инструкции соотношений $C*t*K = 0,2 / (300 \times 10^{-5})$.

Нормальные показатели

Активность α-амилазы в сыворотке крови составляет 3,3–8,9 мг / (сек*л), в моче – до 44 мг / (сек*л).

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Ответить на вопросы:

1. Какие методы используются для определения активностей АЛТ в сыворотке крови, α-амилазы в моче?
2. На чем основан метод Каравея?
3. Какая реакция лежит в основе методики определения активности α-амилазы в сыворотке крови по методу Каравея?
4. Для чего используют концентрированный раствор йода в методике определения активности α-амилазы в сыворотке крови, моче по методу Каравея?
5. Какую клинико-диагностическую информацию дает определение активностей активности α-амилазы в сыворотке крови, моче?
6. Определение каких лабораторных показателей проводят при подозрении на патологию поджелудочной железы?
7. В каких единицах выражаются активности α-амилазы, АЛТ?

ТЕМА 5.4. ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖЕЛУДОЧНОЙ СЕКРЕЦИИ И ДУОДЕНАЛЬНОГО СОДЕРЖИМОГО

ВВЕДЕНИЕ

Основными функциями желудка являются химическая обработка пищи и транспорт ее в кишечник. Также желудок выполняет всасывательную, выделительную и инкреторную функции.

Важным критерием для оценки как функционального, так и морфологического состояния слизистой оболочки желудка является исследование его секреторной функции. Оценка последней осуществляется путем анализа извлеченного с помощью зонда желудочного содержимого.

Желудочный сок – продукт внешнесекреторной и экскреторной деятельности желез желудка, имеет сложный неорганический (вода, соляная кислота, хлориды, сульфаты, фосфаты, бикарбонаты, аммиак, натрий, калий, кальций, магний, водород) и органический (вещества белковой и небелковой природы) состав, отличаясь от других пищеварительных секретов выраженной кислой реакцией, особенностями ферментов и высокомолекулярных соединений. Объем и состав сока варьируют в зависимости от соотношения нервных и гуморальных факторов, вида и силы раздражителя, видовых и возрастных особенностей организма, давления в полости желудка.

Исследование желудочного сока включает определение физических свойств, химическое и микроскопическое исследования.

Для анализа ферментообразующей функции желудка проводят определение активности пепсина, а также анализ продуктов его метаболизма.

Поступление в двенадцатиперстную кишку (ДПК) соляной кислоты усиливает образование желчи в печени, одна и из основных задач которой – обеспечение пищеварения и двигательной активности кишечника. Выделение желчи в кишечник происходит в результате согласованных действий функций печени, общего желчного протока, сфинктера Одди и желчного пузыря.

С целью выявления заболеваний желчных путей применяется метод дуоденального зондирования с последующим лабораторным изучением содержимого ДПК.

При зондировании ДПК может быть выявлено нарушение сократительной функции желчевыводящих путей, снижение концентрационной способности желчного пузыря, воспалительный процесс желчевыводящих путей, изменение коллоидной стабильности желчи, паразиты.

ЦЕЛЬ

Знакомство с алгоритмом, принципами, методиками и современными технологиями оценки желудочной секреции и лабораторного исследования желудочного и дуоденального содержимого.

Приобретение практических навыков по определению антител к Helicobacter pylori в сыворотке крови иммунохроматографическим экспресс-методом.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Физиология желчеобразования. Физиологическое значение желчи.

2. Методики получения дуоденального содержимого: многомоментное и хроматическое зондирования.
3. Алгоритм и методы исследования дуоденального содержимого: определение общих физических свойств дуоденального содержимого.
4. Алгоритм и методы химико-микроскопического исследования дуоденального содержимого: технологии приготовления микропрепаратов, оценка осадочных образований желчи.
5. Бактериологическое исследование дуоденального содержимого.
6. Клинико-диагностическое значение исследования физических свойств различных порций желчи.
7. Анатомо-гистологическое строение желудка. Типы и функции клеток фундальных, кардиальных, пилорических желез.
8. Функции желудка: секреторная, двигательно-эвакуаторная (моторная), выделительная, всасывательная. Фазы желудочной секреции: сложно-рефлекторная, нервно-химическая, кишечная.
9. Способы получения желудочного содержимого: метод фракционного, многомоментного зондирования по Н.И. Лепорскому, метод Шилова–Коростовцева с использованием парантерального раздражителя. Энтеральные и парантеральные стимуляторы желудочной секреции. Преимущества и недостатки фракционного метода получения желудочного содержимого. Техника зондирования по методу Веретянова–Новикова–Мясоедова.
10. Алгоритм и методы исследования желудочного содержимого: определение общих свойств желудочного содержимого (количество, цвет, примеси).
11. Алгоритм и методы химического исследования желудочного содержимого: анализ кислотообразующей функции желудка методом Михаэлиса, методом Тепфера; определение дебита соляной кислоты, определение молочной кислоты по реакции Уффельмана.
12. Алгоритм и методы микроскопического исследования желудочного содержимого: технология приготовления микропрепаратов, обнаружение элементов воспаления, остатков пищи, флоры, кристаллических образований.
13. Внутрижелудочная pH-метрия.
14. Беззондовые методы определения кислотности желудочного сока. Определение функционального состояния в базальную секрецию с применением ацидотеста. Десмоидная проба по Сали.

15. Определение ферментообразующей функции желудка: исследование активности пепсина по В. Н. Туголукову, определение уропепсина.
16. Иммунодиагностика заболеваний желудка: определение в сыворотке крови пепсиногена I, пепсиногена II, гастрина-17 и антител к Helicobacter pylori.

Лабораторная работа №1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К HELICOBACTER PYLORI В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ ЭКСПРЕСС-МЕТОДОМ

Принцип метода

Выявление всех изотипов (IgG, IgM, IgA) антител (АТ) к Helicobacter pylori основано на принципе качественного одноэтапного иммунохроматографического анализа (ИХА).

Испытуемый образец всасывается поглощающим участком тестовой полоски (в индикаторной зоне нанесены: антиген (АГ) Helicobacter pylori с частицами коллоидного золота, АГ Helicobacter pylori, козлиные антитела (АТ) к Helicobacter pylori), взаимодействует с коньюгатом (окрашивается частицами коллоидного золота) и мигрирует к тестовой линии. При наличии в анализируемом образце АТ к Helicobacter pylori последние связываются с АГ Helicobacter pylori, иммобилизованными на нитроцеллюлозной мембране в тестовой зоне, образуя окрашенный комплекс АГ-АТ, проявляющийся в тестовой зоне кассеты в виде линии розово-фиолетового цвета. Не связавшиеся АГ Helicobacter pylori с частицами коллоидного золота продолжают двигаться по мембране и в зоне контроля связываются с козлиными АТ к Helicobacter pylori, образуя цветную линию. Результаты реакции оценивают визуально.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Ход работы

1. Для выполнения анализа рекомендуется использовать готовый набор реагентов.
2. Анализируемые образцы и компоненты набора перед проведением анализа довести до комнатной температуры (18–25 °С) в течении не менее 5 минут.

3. Извлечь тест-полоску из индивидуальной упаковки, поместить на чистую, сухую и ровную поверхность.
4. Держа пипетку вертикально, нанести 4 капли сыворотки (приблизительно 100 мкл) на пористую мембрану теста и включить таймер.
5. Через 10 минут визуально оценить появление окрашенной линий(й). *Не интерпретировать результат по истечении 30 минут!*

Учет результатов тестирования

Положительный результат: если в анализируемом образце присутствуют АТ к Helicobacter pylori, на тест-полоске образуются две параллельные окрашенные линии. Одна линия образуется в контрольной области (С), другая – в тестовой области (Т). Интенсивность окрашивания линии в тестовой области (Т) может варьировать в зависимости от концентрации АТ Helicobacter pylori в пробе. Поэтому любая интенсивность окрашивания линии в тестовой области (Т) должна интерпретироваться как положительный результат.

Отрицательный результат: если в анализируемом образце отсутствуют АТ Helicobacter pylori, в контрольной области (С) появляется одна окрашенная линия.

Ошибка тестирования: из-за недостаточного объема пробы или неправильной процедуры проведения анализа контрольная линия может не появиться. В данном случае необходимо проверить методику выполнения процедуры и повторить анализ с новым тест-набором.

Нормальные показатели

В норме при отсутствии клинических симптомов у здорового человека АТ к Helicobacter pylori не обнаруживаются.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Ответить на вопросы:

1. Какие методы используются для оценки ферментообразующей функции желудка?
2. На чем основан ИХА антител к Helicobacter pylori?

3. Какая реакция лежит в основе методики определения молочной кислоты в желудочном соке?
4. Какую клинико-диагностическую информацию дает определение крови, молочной кислоты в желудочном соке?
5. Определение каких лабораторных показателей проводят при подозрении на нарушение процесса желчеобразования?
6. Какую клинико-диагностическую информацию дает бактериологическое исследование дуоденального содержимого?
7. Какую клинико-диагностическую информацию дает исследования физических свойств различных порций желчи?
8. На чем основана иммунодиагностика заболеваний желудка?

ТЕМА 5.5. ОСОБЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭНДОКРИННЫХ НАРУШЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

Основные подходы к обследованию пациентов с эндокринными заболеваниями принципиально не отличаются от принятых в клинике внутренних болезней, при этом необходимо учитывать, что нарушение функции эндокринной железы, как правило, сопровождается изменением со стороны нескольких, а иногда большинства органов и систем. Несмотря на то, что установление диагноза большинства эндокринопатий требует верификации лабораторными или инструментальными методами, доминирующее значение имеют данные анамнеза и физикального исследования.

Только в том случае, если на основании анамнеза или при анализе клинической картины заподозрено эндокринное заболевание, показано проведение соответствующего гормонального исследования, которое подтвердит или отвергнет это подозрение. При этом в большинстве случаев гормональное исследование имеет не ключевое, а верифицирующее значение для постановки диагноза.

Гормоны представляют собой биологически активные вещества, регулирующие функции организма путем переноса специфической информации. Гормоны вырабатываются специализированными органами или группой клеток (железами внутренней секреции), оказывают действие на обменные процессы.

При гормональном исследовании может быть выявлено снижение продукции того или иного гормона (гипофункция железы), повышение уровня гормона (гиперфункция) или его нормальный уровень.

ЦЕЛЬ

Знакомство с особенностями, алгоритмом, принципами, методиками исследования лабораторных маркеров эндокринных нарушений.

Приобретение практических навыков по определению концентрации антител к тиреопероксидазе в сыворотке крови иммуноферментным методом.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Алгоритмы и методы диагностики заболеваний щитовидной железы.
2. Алгоритмы и методы диагностики заболеваний надпочечников.
3. Алгоритмы и методы диагностики заболеваний паращитовидных желез.
4. Алгоритмы и методы диагностики заболеваний гипофиза.
5. Алгоритмы и методы диагностики заболеваний гипоталамуса.
6. Алгоритмы и методы диагностики дисфункции мужских половых желез (яичек).
7. Алгоритмы и методы диагностики дисфункции женских половых желез (яичников).
8. Алгоритмы и методы диагностики болезней тимуса.
9. Некоторые ошибки при простановке ИФА.

Лабораторная работа №1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИТЕЛ К ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЕ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца во время первой инкубации происходит связывание антител (АТ) к тиреопероксидазе (ТПО) с ТПО, иммобилизированной на внутренней поверхности лунок. Во время второй инкубации при добавлении конъюгата происходит связывание антител к IgG, конъюгированных с пероксидазой, с АТ к ТПО, иммобилизированными в ходе первой реакции. После удаления избытка несвязавшегося конъюгата, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина, происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации АТ к ТПО в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного

графика рассчитывается концентрация Анти-ТПО в анализируемых образцах.

Материал исследования

Сыворотка крови.

Реагенты

- калибровочные образцы анти-ТПО 0; 25; 100; 250; 500; 1000 Ед/л;
- контрольный образец анти-ТПО;
- конъюгат АТ к IgG с пероксидазой хрена;
- раствор для предварительного разведения сывороток;
- раствор для разведения сывороток;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином;
- раствор тетраметилбензидина;
- стоп-реагент.

Ход работы

1. Для проведения исследования рекомендуется использовать готовый набор реагентов. Контрольный, калибровочные образцы, конъюгат, раствор тетраметилбензидина (ТМБ) и стоп-реагент готовы к использованию. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре в течение не менее 30 минут.
2. Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов.
3. Исследуемые образцы сыворотки крови развести в 10 раз: внести в лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки крови, тщательно перемешать. *При разведении сыворотки красный цвет должен измениться на желтый.*
4. Приготовить промывочный раствор: внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т) и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов:

Количество используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т, мл	Дистиллированная вода, мл
2	2,0	2,0	4,0	до 100
3	3,0	3,0	6,0	до 150
4	4,0	4,0	8,0	до 200
5	5,0	5,0	10,0	до 250
6	6,0	6,0	12,0	до 300
7	7,0	7,0	14,0	до 350
8	8,0	8,0	16,0	до 400
9	9,0	9,0	18,0	до 450
10	10,0	10,0	20,0	до 500
11	11,0	11,0	22,0	до 550
12	12,0	12,0	24,0	до 600

5. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждого калибровочного образца и по 100 мкл контрольного образца.
6. В остальные лунки внести в дубликатах по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл анализируемых образцов сыворотки крови в предварительном разведении, тщательно перемешать.
7. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 минут при встряхивании на шейкере при температуре 37 °С и 650 об./мин.
8. Содержимое лунок удалить отсасыванием и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора. Процесс промывки повторить еще 4 раза.
9. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата, заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 минут при встряхивании на шейкере при температуре 37 °С и 650 об./мин.
10. Содержимое лунок удалить и промыть лунки так, как указано в п. 9.
11. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ и инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 минут при встряхивании на шейкере при температуре 37 °С и 650 об./мин.
12. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 секунд. *При этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.*

13. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм.

Нормальные показатели

У лиц до 50 лет – от 0,1 до 34,0 Ед/л; старше 50 лет – до 100,0 Ед/л.

Оформление работы

Указать принцип исследования, ход работы, результаты исследования, отметить клинико-диагностическое значение полученных данных и сделать вывод о возможной патологии.

Ответить на вопросы:

1. На каких этапах проведения ИФА наиболее вероятны ошибки?
2. На чем основан ИФА АТ к ТПО?
3. Какие клинико-лабораторные исследования рекомендуется проводить при диагностике дисфункции мужских половых желез?
4. Какую клинико-диагностическую информацию дает анализ тиреоидного статуса?
5. Определение каких лабораторных показателей проводят при подозрении на нарушение функций гипофиза?
6. Какую клинико-диагностическую информацию дает анализ гормонального статуса при исследовании дисфункции женских половых желез?
7. На чем основана диагностика заболеваний тимуса?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ

1. МИНИМАЛЬНЫЙ РЕКОМЕНДУЕМЫЙ ОБЪЕМ ПЕРВОГО УТРЕННЕГО ОБРАЗЦА МОЧИ ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА, ДОСТАТОЧНЫЙ ДЛЯ ПОЛНОЦЕННОГО ТОЧНОГО ХИМИКО-МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ, РАВЕН
    1) 10 мл
    2) 15 мл
    3) 100 мл
    4) 50 мл

2. ОБРАЗЕЦ МОЧИ, СОБРАННЫЙ В ЛЮБОЕ НЕУСТАНОВЛЕННОЕ ВРЕМЯ, НАЗЫВАЕТСЯ
    1) суточным
    2) специальным
    3) рандомизированным
    4) первым утренним

3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ КОНСЕРВАНТА ДЛЯ МОЧИ КРИСТАЛЛОВ ТИМОЛА МОЖЕТ ДАВАТЬ ЛОЖНОПО-ЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ НА
    1) белок
    2) кетоновые тела
    3) бактерии
    4) эритроциты

4. ВАКУУМНЫЕ ПРОБИРКИ С ОКСИДОМ РТУТИ ПОЗВОЛЯЮТ СОХРАНЯТЬ МОРФОЛОГИЮ ТИПИЧНЫХ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ МОЧЕВОГО ОСАДКА В ИСХОДНОМ СОСТОЯНИИ В ТЕЧЕНИЕ
    1) не более 72 часов
    2) более 72 часов
    3) не более 12 часов
    4) не более 24 часов

5. ПРИ ПОДОЗРЕНИИ НА ГОНОРЕЮ МОЖНО ИССЛЕДОВАТЬ ПРЕПАРАТ ОСАДКА ПЕРВОЙ ПОРЦИИ УТРЕННЕЙ МОЧИ, ОКРАШЕННЫЙ

1) по Романовскому–Гимзе
2) 1 % раствором метиленового синего
3) суданом III
4) по Папаниколау

6. РЕКОМЕНДУЕМЫМИ УСЛОВИЯМИ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ МОЧИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОСАДКА ЯВЛЯЮТСЯ

1) 600 g в течение 5 минут
2) 400 g в течение 15 минут
3) 400 g в течение 5 минут
4) 600 g в течение 15 минут

7. У ВЗРОСЛЫХ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ «ПОЧЕЧЕНЫЙ ПОРОГ» КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ В СРЕДНЕМ СОСТАВЛЯЕТ

1) 3,5–10,0 моль/л
2) 5,5–6,5 ммоль/л
3) 9,0–10,0 ммоль/л
4) 4,5–5,5 ммоль/л

8. У ЗДОРОВОГО НОВОРОЖДЕННОГО РН КОНЕЧНОЙ МОЧИ СОСТАВЛЯЕТ

1) 3,5–4,0
2) 1,5–2,0
3) 9,5–10,0
4) 5,5–6,0

9. ПРОЦЕДУРА НАГРЕВАНИЯ НЕПРОЗРАЧНОЙ МОЧИ С ПОСЛЕДУЮЩИМ ЕЕ ПРОСВЕТЛЕНИЕМ, ПОЗВОЛЯЕТ УСТАНОВИТЬ ПРИЧИНУ ПОМУТНЕНИЯ – НАЛИЧИЕ В ЖИДКОСТИ

1) фосфатов
2) уратов
3) липидов
4) карбонатов

10. УНИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДОМ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА В МОЧЕ ЯВЛЯЕТСЯ РЕАКЦИЯ С

1) ортотолуидином

2) пирогаллоловым красным
3) раствором сульфосалициловой кислоты
4) нитропруссидом натрия

11. К ЭЛЕМЕНТАМ ОРГАНИЗОВАННОГО ОСАДКА МОЧИ ОТНОСЯТ
1) трипельфосфаты
2) ураты
3) цилиндры
4) оксалаты

12. ПРИ МИКРОСКОПИРОВАНИИ КРИСТАЛЛЫ ХОЛЕСТЕРИНА В ОСАДКЕ МОЧИ ИМЕЮТ ВИД
1) бесцветных четырехгранных пластин с обрезанными углами и/или ступенеобразными уступами
2) бесцветных удлиненных тонких игл
3) ромбических призм
4) блестящих шаров с концентрической исчерченностью

13. У ЖЕНЩИН КОЛИЧЕСТВО ЛЕЙКОЦИТОВ В ПОЛЕ ЗРЕНИЯ ПРИ МИКРОСКОПИРОВАНИИ ОСАДКА МОЧИ В НОРМЕ СОСТАВЛЯЕТ
1) до 5 клеток
2) 45–50 клеток
3) 100–120 клеток
4) 10–20 клеток

14. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ ПАРАМЕТР НА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ПОЛОСКЕ, ПОЗВОЛЯЮЩИЙ УЧЕСТЬ РИСК ПОЛУЧЕНИЯ НЕПРАВИЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МОЧИ, – ЭТО ТЕСТ НА
1) гемоглобин
2) аскорбиновую кислоту
3) глюкозу
4) относительную плотность

15. РЕФЕРЕНТНЫМ МЕТОДОМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ В МОЧЕ ЯВЛЯЕТСЯ РЕАКЦИЯ С
1) сульфатом аммония
2) ледяной уксусной кислотой
3) насыщенным раствором нитропруссида натрия
4) ортотолуидином

16. МЕТОД-ЗАВИСИМОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЯЕМОГО ПОКАЗАТЕЛЯ, УКАЗЫВАЕМОЕ ИЗГОТОВИТЕЛЕМ КОНТРОЛЬНОГО МАТЕРИАЛА В ПАСПОРТЕ ИЛИ ИНСТРУКЦИИ, НАЗЫВАЕТСЯ

1) установленным
2) правильным
3) истинным
4) средним

17. СОВРЕМЕННАЯ НОМЕНКЛАТУРА КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ЦЕЛЯХ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНЕЙ И СЛЕЖЕНИЯ ЗА СОСТОЯНИЕМ ПАЦИЕНТОВ В УЧРЕЖДЕНИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, УТВЕРЖДЕНА ПРИКАЗОМ

1) Минздрава РФ от 21.02.2000 года № 64
2) Минздрава РФ от 07.02.2000 года № 45
3) Минздрава СССР от 04.10.1980 года № 1030
4) Минздрава РФ от 25.12.1997 года № 380

18. ПЕРЕЧЕНЬ И ОБРАЗЦЫ ФОРМ ПЕРВИЧНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ ДЛЯ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ПРЕДСТАВЛЕНЫ В ПРИЛОЖЕНИИ

1) приказа Минздрава СССР от 04.10.1980 года № 1030
2) приказа Минздрава РФ от 25.12.1997 года № 380
3) приказа Минздрава РФ от 03.05.1995 года № 117
4) приказа Минздрава РФ от 07.02.2000 года № 45

19. ОДНОРАЗОВЫЕ ПАКЕТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ СБОРА МЕДИЦИНСКИХ ОТХОДОВ КЛАССОВ Б И В, ДОЛЖНЫ ОБЕСПЕЧИВАТЬ ВОЗМОЖНОСТЬ БЕЗОПАСНОГО СБОРА ОТХОДОВ В НИХ НЕ БОЛЕЕ

1) 10 кг
2) 20 кг
3) 15 кг
4) 40 кг

20. ИНСТРУКТАЖ ПО СОБЛЮДЕНИЮ ТРЕБОВАНИЙ К ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТ С АЭРОЗОЛЯМИ МИКРООРГАНИЗМОВ I-II ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ (ОПАСНОСТИ) ПРОВОДИТСЯ ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТ

1) ежеквартально
2) еженедельно
3) ежемесячно
4) ежедневно

21. РТУТЬСОДЕРЖАЩИЕ ПРИБОРЫ, ЛАМПЫ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ – ЭТО ОБОРУДОВАНИЕ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К МЕДИЦИНСКИМ ОТХОДАМ КЛАССА

1) Г
2) Д
3) В
4) Б

22. ОТХОДЫ ЦИТОСТАТИКОВ, ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ И ВСЕХ ВИДОВ ОТХОДОВ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ИХ РАСТВОРОВ (ФЛАКОНЫ, АМПУЛЫ И ПРОЧЕЕ), ОТНОСЯТСЯ К МЕДИЦИНСКИМ ОТХОДАМ КЛАССА

1) Б
2) В
3) Г
4) Д

23. СБОР ОТХОДОВ КЛАССА А ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ В МНОГОРАЗОВЫЕ ЕМКОСТИ ИЛИ ОДНОРАЗОВЫЕ ПАКЕТЫ ПРЕИМУЩЕСТВЕННО

1) черного цвета
2) желтого цвета или имеющие желтую маркировку
3) красного цвета или имеющие красную маркировку
4) белого цвета

24. ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ОДНОРАЗОВЫХ КОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ ОТХОДОВ ОСТРОГО ИНСТРУМЕНТАРИЯ ДОПУСКАЕТСЯ ИХ ЗАПОЛНЕНИЕ В ТЕЧЕНИЕ НЕ БОЛЕЕ

1) 2-х суток
2) 1-х суток
3) 7-и суток
4) 3-х суток

25. ХАРАКТЕРИСТИКА КАЧЕСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ОТРАЖАЮЩАЯ БЛИЗОСТЬ ДРУГ К ДРУГУ ЗНАЧЕНИЙ РЕЗУЛЬТАТОВ ОДНОЙ И ТОЙ ЖЕ ВЕЛИЧИНЫ ПО ОДНОЙ МЕТОДИКЕ В ОДИНАКОВЫХ УСЛОВИЯХ И ПРАКТИЧЕСКИ ОДНОВРЕМЕННО (ПАРАЛЛЕЛЬНЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ) – ЭТО

1) повторяемость
2) воспроизводимость
3) прослеживаемость
4) точность

26. СОВОКУПНОСТЬ ОПЕРАЦИЙ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ЗНАЧЕНИЯ ВЕЛИЧИНЫ НАЗЫВАЕТСЯ

1) средством испытания
2) протоколом испытания
3) процессом измерения
4) методикой исследования

27. СТЕПЕНЬ БЛИЗОСТИ РЕЗУЛЬТАТА ИЗМЕРЕНИЯ К ИСТИННОМУ ЗНАЧЕНИЮ ИЗМЕРЯЕМОЙ ВЕЛИЧИНЫ НАЗЫВАЕТСЯ

1) точностью
2) прослеживаемостью
3) надежностью
4) правильностью

28. КОМПОНЕНТ ИЛИ ХАРАКТЕРИСТИКУ ОБРАЗЦА, ПОДЛЕЖАЩИЕ ИЗМЕРЕНИЮ, НАЗЫВАЮТ

1) величиной
2) аликвотой
3) матрицей
4) аналитом

29. НАИМЕНЬШЕЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ВАРИАЦИЕЙ ИЗ ПЕРЕЧИСЛЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ОБЛАДАЕТ

1) мочевина
2) натрий
3) креатинин
4) глюкоза

30. ФАКТОРОМ АНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ИССЛЕДОВАНИЯ, ВЛИЯЮЩИМ НА РЕЗУЛЬТАТ ЛАБОРАТОРНОГО АНАЛИЗА, МОЖЕТ БЫТЬ

1) центрифугирование
2) инкубирование
3) перемешивание
4) аликвотирование

31. К НЕИЗМЕННОМУ ФАКТОРУ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА, ВЛИЯЮЩЕМУ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ, МОЖНО ОТНЕСТИ

1) положение тела
2) расу

3) характер питания
4) физическую активность

32. ДЛЯ АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ, ЛАКТАТА, ЭТАНОЛА В КРОВИ РЕКОМЕНДУЕТСЯ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ПРОБИРКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

1) с гепарином
2) без добавок
3) с фторидом натрия и ЭДТА
4) с цитратом натрия и лимонной кислотой

33. К АКТИВАТОРАМ СВЕРТЫВАНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫМ В ПРОБИРКАХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ, ОТНОСЯТСЯ

1) ЭДТА, фторид натрия
2) йодоацетат, цитрат натрия
3) кремнезем, тромбин
4) гепарин натрия, гепарин лития

34. ОСНОВНАЯ ФУНКЦИЯ РЕФЕРЕНТНОЙ ЛАБОРАТОРИИ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В

1) статистической обработке результатов
2) изготовлении контрольных материалов
3) выполнении рутинных анализов
4) аттестации контрольных материалов референтными методами

35. МЕЖЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ДАЕТ ВОЗМОЖНОСТЬ

1) сравнить качество работы нескольких лабораторий
2) оценить качество используемых методов, оборудования
3) стандартизировать методы исследования
4) провести аттестацию контрольных материалов

36. МЕЖПОВЕРОЧНЫЙ ИНТЕРВАЛ ДЛЯ СТАЦИОНАРНЫХ ГАЗОАНАЛИЗАТОРОВ И ГЕМОГЛОБИНОМЕТРОВ, ПОДЛЕЖАЩИХ МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ ПОВЕРКЕ, СОСТАВЛЯЕТ

1) 12 месяцев
2) 60 месяцев
3) 24 месяца
4) 6 месяцев

37. ТИПИЧНЫМ ПРИЗНАКОМ МОКРОТЫ ПРИ МИКРОСКОПИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ ЯВЛЯЕТСЯ НАЛИЧИЕ

1) альвеолярных макрофагов

2) липофагов
3) кониофагов
4) ксантомных клеток

38. РЖАВЫЙ ЦВЕТ МОКРОТЫ ТИПИЧЕН ДЛЯ
1) легочного кровотечения
2) крупозной пневмонии
3) желтухи
4) гангрене

39. ГНОЙНАЯ МОКРОТА ВЫДЕЛЯЕТСЯ ПРИ
1) бронхиальной астме
2) остром бронхите
3) отеке легкого
4) абцессе легкого

40. В КАЧЕСТВЕ ОСНОВНОГО КРАСИТЕЛЯ В МЕТОДИКЕ ОКРАСКИ ПО ЦИЛЮ–НИЛЬСОНУ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ
1) метиленовый синий
2) метиловый зеленый
3) фуксин
4) сафранин Т

41. ПОЯВЛЕНИЕ СПИРАЛЕЙ КУРШМАНА В МОКРОТЕ НАБЛЮДАЕТСЯ ПРИ
1) пневмонии
2) абцессе легкого
3) хроническом бронхите
4) бронхиальной астме

42. ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ В МОКРОТЕ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА НЕОБХОДИМО ИССЛЕДОВАТЬ
1) нативный препарат
2) препарат, окрашенный по Граму
3) препарат, окрашенный по Цилю–Нильсену
4) препарат, окрашенный по Романовскому

43. ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КРАХМАЛА И ЙОДОФИЛЬНОЙ ФЛОРЫ ИССЛЕДУЮТ ПРЕПАРАТ КАЛА С
1) раствором Люголя
2) метиленовым синим
3) уксусной кислотой
4) суданом III

44. МАКРОСКОПИЧЕСКИ ВИДИМАЯ ПРИМЕСЬ СЛИЗИ НА ПОВЕРХНОСТИ КАЛА МОЖЕТ СВИДЕТЕЛЬСТВОВАТЬ О

1) воспалении в нижних отделах толстого кишечника
2) воспалении в тонком кишечнике
3) воспалительном процессе в поджелудочной железе
4) воспалении в верхних отделах толстого кишечника

45. ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ НЕЙТРАЛЬНОГО ЖИРА В КАЛЕ ИСПОЛЬЗУЮТ

1) глицерин
2) 1 % водный раствор метиленового синего
3) раствор судана III
4) раствор Люголя

46. В СОСТАВ РЕАКТИВА САМСОНА ВХОДЯТ

1) серная кислота, салициловая кислота, водный раствор метиленового синего
2) ледяная уксусная кислота, карболовая кислота, спиртовой раствор фуксина
3) серная кислота, трихлоруксусная кислота, водный раствор фуксина
4) азотная кислота, салициловая кислота, спиртовой раствор метиленового синего

47. СНИЖЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ ЛИКВОРА НАБЛЮДАЕТСЯ ПРИ

1) сахарном диабете
2) менингитах
3) уремии
4) гидроцефалии

48. ДЛЯ АНАЛИЗА ПРОЗРАЧНОСТИ ЛИКВОРА СЛЕДУЕТ

1) определить степень помутнения с помощью тест-полосок
2) сравнить образец ликвора с дистиллированной водой на белом фоне
3) сравнить образец ликвора с дистиллированной водой на темном фоне
4) определить степень помутнения ликвора в проходящем свете

49. ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОВЫШЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В ЛИКВОРЕ ПРИМЕНЯЮТ РЕАКЦИЮ

1) Панди

2) Нонне–Апельта
3) Фуше
4) Фридмана

50. У ЗДОРОВОГО ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА СОДЕРЖАНИЕ ГЛЮКОЗЫ В ЛЮМБАЛЬНОМ ЛИКВОРЕ НАХОДИТСЯ В ПРЕДЕЛАХ

1) 2,8–3,9 ммоль/л
2) 1,8–2,9 ммоль/л
3) 3,8–4,9 ммоль/л
4) 2,0–2,5 ммоль/л

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача №1. При проведении в стационаре у пациентки функциональной 2-х стаканной пробы выявили повышенное содержание лейкоцитов в 1-м стакане мочи.

Укажите возможную локализацию воспаления у пациентки.

Задача №2. У больного с клинической картиной хронического пиелонефрита в лаборатории не было выявлено характерного увеличения количества лейкоцитов в образце мочи.

Какие методы лабораторного исследования мочи рекомендуется применить для выявления скрытой пиурии у пациента?

Задача №3. При обследовании пациентки Л., 28 лет, которая обратилась к врачу с жалобами на повышенную потливость, резкое и значительное снижение веса за последние 3 месяца, было выявлено диффузное увеличение щитовидной железы, отмечено учащение пульса, легкий тремор пальцев рук. При сборе семейного анамнеза было установлено, что отец, мать и сестра пациентки страдают заболеванием щитовидной железы. При проведении лабораторной оценки тиреоидного статуса было выявлено: содержание гормона T_3 – 4,8 нмоль/л; содержание гормона T_4 – 183 нмоль/л; содержание ТТГ – 0,4 мМЕ/л. Уровень в сыворотке аутоантител к тиреопероксидазе составил 3000 МЕ/мл.

1. *Каково изменение содержания ферментов в сыворотке крови пациентки, уровня аутоантител к тиреопероксидазе и о чем это свидетельствует?*
2. *Какой диагноз можно предположить на основании полученных данных клинико-лабораторных исследований?*
3. *Какие лабораторные исследования следует проводить для мониторинга лечения данного заболевания?*

Задача №4. Ребенок В., 8 лет, поступил в больницу с жалобами на боли в животе, возникшие после приема жирной пищи, сыпь на бедрах, лице. Со слов матери, подобные симптомы беспокоят пациента с 3-летнего возраста. При лабораторном исследовании: сыворотка крови мутная во всем объеме пробирки, при отстаивании в холодильнике в

течение 10 часов образовался мутный сливкообразный верхний слой, под ним сыворотка прозрачная. При проведении лабораторного оценки липидного профиля крови было выявлено: концентрация общего холестерина в сыворотке крови – 18,4 ммоль/л; концентрация триацилглицеролов – 9,9 ммоль/л; концентрация холестерола липопротеинов высокой плотности – 1,8 ммоль/л; активность сывороточной липопротеинлипазы – 0.

1. *Каков референтный интервал уровня холестерина, содержания триацилглицеролов в сыворотке крови?*
2. *В чем заключается основное требование преаналитического этапа для определения липидного профиля?*
3. *О чем свидетельствует появление мутного сливкообразного верхнего слоя крови?*
4. *Какой диагноз можно предположить на основании полученных данных лабораторных исследований?*

Задача №5. Пациентка Н., 32 года, поступила в отделение с жалобами на выраженную слабость, сухость кожных покровов, учащенное дыхание, спутанность сознания, потерю массы тела и учащенное мочеиспускание. Больной себя считает с 28 лет, когда впервые ее стали беспокоить умеренная жажда, учащенное мочеиспускание, слабость. На момент постановки диагноза сахарного диабета уровень глюкозы в крови натощак – 8,4 ммоль/л, уровень HbA1c – 9,2%, специфических осложнений выявлено не было. Уровень показателей липидного профиля и почечной функции – в пределах нормальных значений. Семейный анамнез отягощен по сахарному диабету. Уровень глюкозы в крови натощак при повторных исследованиях составлял 9–13 ммоль/л. Постпрандиальная гликемия – 10,4–13,0 ммоль/л. Для компенсации углеводного обмена назначена инсулинотерапия, по достижении нормогликемии исследована секреция инсулина. Уровень С-пептида в норме, после пробного завтрака повышался в 1,2 раза. Ухудшение состояния в последние 1,5 месяца, отмечены прогрессирование слабости, потеря веса (до 12 кг), повышение уровня гликемии в течение суток на фоне увеличения дозы принимаемого препарата и сокращения употребления углеводов.

1. *Какой диагноз можно предположить на основании полученных данных лабораторных исследований?*
2. *Какую клинико-диагностическое значение имеет определение в крови уровеня HbA1c?*

Задача №6. Больной А., 56 лет, доставлен бригадой скорой медицинской помощи в больницу по поводу интенсивных болей в груди, не проходящих в течение часа. Боли со слов пациента давящие, сжимающие, загрудинные, иррадиирующие в шею, левую челюсть, левое плечо, не проходящие в сидячем положении и после приема нитроглицерина, не связаны с дыханием. В течение 10 лет отмечает повышение АД до 190/110 мм рт. ст. Объективно: ЧДД – 20 уд./мин, в легких хрипов нет, пульс – 80 уд./мин, ритмичный, АД – 150/90 мм рт. ст. Проведено обследование: ЭКГ, определение активности АЛТ, общеклинический анализ крови, исследование газов и электролитов крови, оценка КЩС, уровень мочевины, билирубина крови, оценка центрального венозного давления.

1. *Какой диагноз можно предположить на основании полученных данных лабораторных исследований?*
2. *Какие лабораторные исследования были назначены и проведены не целесообразно, какие обязательные лабораторные исследования не были назначены?*

Задача №7. У больного Д., 40 лет, при выполнении инструментального исследования была обнаружена на снимке округлая тень с бухтообразным распадом в центре, размерами 3,3 см в третьем сегменте правого легкого. Окружающая легочная ткань не изменена. Пациент обратился к врачу с жалобами на длительный сухой надсадный кашель, сопровождающийся, в последнее время, кровохарканьем, снижением веса, слабостью, понижением аппетита. Объективно: над легкими выслушиваются единичные сухие хрипы, тоны сердца ясные, ритмичные. Пульс – 80 уд/мин, ритмичный, АД – 140/90 мм рт. ст. Лабораторный анализ крови: гемоглобин – 95 г/л, эритроциты – $3,6*10^{12}$/л, лейкоциты – $5,18*10^{9}$/л, СОЭ – 44 мм/час.

1. *Какой диагноз можно предположить на основании полученных данных лабораторных исследований?*
2. *Составить план обследования для верификации диагноза.*

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ
К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

Номер вопроса	Номер ответа	Номер вопроса	Номер ответа
1	**1**	26	**3**
2	**3**	27	**1**
3	**1**	28	**4**
4	**1**	29	**2**
5	**2**	30	**2**
6	**3**	31	**2**
7	**3**	32	**3**
8	**4**	33	**3**
9	**2**	34	**4**
10	**3**	35	**1**
11	**3**	36	**1**
12	**1**	37	**1**
13	**1**	38	**2**
14	**2**	39	**4**
15	**4**	40	**3**
16	**1**	41	**4**
17	**1**	42	**3**
18	**1**	43	**1**
19	**1**	44	**1**
20	**4**	45	**3**
21	**1**	46	**2**
22	**3**	47	**4**
23	**4**	48	**3**
24	**4**	49	**1**
25	**1**	50	**1**

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ

Задача №1. Возможная локализация воспаления у пациентки – мочеиспускательный канал (уретрит) и/или наружные половые органы (вульвит).

Задача №2. Для выявления скрытой пиурии у пациента необходимо провести исследование средней порции утренней мочи по Нечипоренко и бактериологическое исследование биоматериала.

Задача №3. На основании полученных данных клинико-лабораторных исследований можно предположить гипертиреоз аутоиммунной наследственной природы. Для мониторинга лечения данного заболевания необходимо проводить динамичное исследование тиреоидного статуса и уровня АТ к ТПО.

Задача №4. Референтный интервал уровня холестерина составляет менее 5 ммоль/л, нормальный уровень содержания триацилглицеролов в сыворотке крови менее 1,77 ммоль/л, ЛПВП менее 1 ммоль/л. Основным требованием преаналитического этапа (подготовки пациента к сдаче крови) для определения липидного профиля крови является соблюдение диеты и голодания в течение не менее 12 ч. Появление мутного сливкообразного верхнего слоя крови пациента свидетельствует о повышенном содержании хиломикронов и триацилглицеролов в крови. На основании полученных данных лабораторных исследований у ребенка можно предположить дислипопротеинемию.

Задача №5. На основании полученных данных лабораторных исследований у пациентки можно предположить сахарный диабет 1-го типа в фазе декомпенсации. Концентрация гликированного гемоглобина (HbA1c) – специфического соединения гемоглобина эритроцитов с глюкозой – отражает среднее содержание глюкозы в крови за период около трех месяцев.

Задача №6. На основании полученных данных лабораторных и клинических исследований можно предположить развитие острого инфаркта миокарда. Обязательные лабораторные исследования – определение уровня кардиомаркеров в динамике.

Задача №7. Предварительный диагноз: в данной клинической ситуации можно предположить о наличии у больного следующих заболеваний: распадающийся рак легкого или деструктивная пневмония. Больше данных за наличие у больного распадающейся опухоли (первично-полостного рака). Наличие длительного, сухого, надсадного кашля, кровохарканья (прожилки крови в мокроте), наличие астенического синдрома, умеренная анемия, высокое СОЭ, наличие характерной рентгенологической картины. План обследования: для верификации диагноза необходимо провести фибробронхоскопию с биопсией содержимого бронхов на атипические клетки и МБТ, подкожную пробу с туберкулином.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАЧЕТУ

1. Клиническая лабораторная диагностика как медицинская специальность: цель, задачи, значение и доля в комплексе диагностических обследований, перечень специализаций в составе дисциплины. Нормативно-правовая основа организации лабораторной службы в РФ.
2. Ключевые этапы выполнения лабораторных исследований. Технология составления заявки (направления) на лабораторные исследования. Подготовка пациента к лабораторным исследованиям. Процедура взятия крови.
3. Организация доставки образцов биологического материала в лабораторию. Технология оценки результатов лабораторных исследований: единицы измерения, используемые в клинико-диагностических лабораториях, понятие нормальной и референтной величин. Биологическая и ятрогенная вариации. Использование результатов лабораторных исследований в лечебно-диагностическом процессе.
4. Понятие контроля качества клинических лабораторных исследований. Виды контроля качества. Этапы контроля качества. Унификация и принципы стандартизации клинических лабораторных методов.
5. Теоретические основы контроля качества лабораторных исследований (термины и определения). Источники погрешностей, выявляемые системой внутрилабораторного контроля качества: внутренние (лабораторные) и внешние факторы.
6. Относительная систематическая погрешность (смещение, сдвиг): алгоритм расчета. Величина случайной погрешности: расчет среднеквадратического отклонения и коэффициента вариации. Контрольные материалы: виды, требования, рекомендации по выбору, правила использования.
7. Порядок проведения внутрилабораторного контроля качества. «Контрольные» правила Вестгарда. Внешняя оценка качества лабораторных исследований: понятие, цели, системы.

8. Понятие о химико-микроскопических (общеклинических) исследованиях мочи: алгоритмы, методы, клинико-диагностическое значение.
9. Понятие о химико-микроскопических (общеклинических) исследованиях кала: алгоритмы, методы, клинико-диагностическое значение.
10. Понятие о химико-микроскопических (общеклинических) исследованиях ликвора: алгоритмы, методы, клинико-диагностическое значение.
11. Понятие о химико-микроскопических (общеклинических) исследованиях мокроты: алгоритмы, методы, клинико-диагностическое значение.
12. Лабораторные исследования показателей обмена липидов и их клинико-диагностическое значение.
13. Алгоритм лабораторной диагностики инфаркта миокарда. Понятие о сывороточных биомаркерах острого инфаркта миокарда и методах их определения. Изменения миокардиальных маркеров при других заболеваниях.
14. Современное определение и классификации сахарного диабета. Критерии и алгоритмы диагностики различных типов сахарного диабета. Методы изучения углеводсодержащих белков и их компонентов в крови. Осложнения (острые и поздние) сахарного диабета и их лабораторный мониторинг.
15. Определение понятия и клинико-лабораторная диагностика метаболического синдрома.
16. Лабораторные показатели синдрома воспаления и методы их исследования.
17. Алгоритм и методы лабораторного выявления ведущих синдромов поражения почек.
18. Принципы традиционных и современных биохимических и микроскопических лабораторных исследований. Классификации биохимических автоматических анализаторов.
19. Нарушения водного обмена (дисгидрии): общее обезвоживание; внеклеточная и клеточная дегидратации; общая, внеклеточная и клеточная гипергидратации.
20. Методы определения и клинико-диагностическое значение определения калия и натрия в крови (гипо- и гиперкалиемия, гипо- и гипернатриемия (относительная и абсолютная)).

21. Методы определения уровня кальция в сыворотке (плазме) крови. Клинико-диагностическое значение определения кальция (физиологическая и патологическая гиперкальциемия, гипокальциемия).
22. Лабораторные методы определения магния в крови. Клинико-диагностическое значение определения магния (гипо- и гипермагниемия).
23. Клинико-диагностическое значение определения хлорид-ионов в биологических жидкостях (гипо- и гиперхлоремия).
24. Методы и клинико-диагностическое значение определения уровня неорганического фосфора в сыворотке крови и моче.
25. Исследование уровня железа сыворотки крови. Определение общей и ненасыщенной железосвязывающей способности сыворотки крови. Клинико-диагностическое значение определения уровня железа и железосвязывающей способности сыворотки крови.
26. Диагностика острого и хронического дыхательного ацидоза: клинические проявления, диагностические тесты, клинико-диагностическое значение исследования.
27. Диагностика острого и хронического дыхательного алкалоза: клинические проявления, диагностические тесты, клинико-диагностическое значение исследования.
28. Диагностика острого и хронического метаболического ацидоза: клинические проявления, диагностические тесты, клинико-диагностическое значение исследования.
29. Диагностика острого и хронического метаболического алкалоза: клинические проявления, диагностические тесты, клинико-диагностическое значение исследования.
30. Понятие о неотложных и экстренных состояниях. Порядок организации выполнения неотложных и экстренных лабораторных исследований. Концепция выполнения лабораторных исследований «point of care testing – POCT». Примерный перечень оборудования для лаборатории экспресс-диагностики.
31. Общие признаки печеночных патологий. Алгоритмы и методы лабораторного обследования пациентов при классических вирусных гепатитах, гепатитах при системных вирусных инфекциях, аутоиммунных заболеваниях печени, заболеваниях печени при бактериальных или паразитарных инфекциях, генетически обусловленных метаболических нарушениях.

32. Ключевые особенности (сложности) диагностики заболеваний поджелудочной железы. Методы лабораторного определения этиологии панкреатита. Функциональные тесты для оценки внешнесекреторной функции поджелудочной железы; лабораторная оценка эндокринной функции поджелудочной железы. Анализ содержания онкомаркеров при опухолях поджелудочной железы.
33. Методики получения, алгоритм и методы исследования дуоденального содержимого. Клинико-диагностическое значение исследования различных порций желчи.
34. Алгоритм и методы исследования желудочного содержимого. Иммунодиагностика заболеваний желудка.
35. Алгоритмы и методы диагностики заболеваний щитовидной железы, паращитовидных желез.
36. Алгоритмы и методы диагностики заболеваний гипофиза, гипоталамуса, тимуса.
37. Алгоритмы и методы диагностики заболеваний мужских и женских половых желез.
38. Алгоритмы и методы диагностики заболеваний надпочечников.
39. Основные принципы иммунологических исследований. Возможные ошибки при простановке ИФА.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Кишкун, А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики [Электронный ресурс] / А.А. Кишкун. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 756 с.: Режим доступа: http://www.studentlibrary.ru.
2. Клиническая лабораторная диагностика. В 2 томах. Том 1 [Электронный ресурс]: национальное руководство / под ред. В.В. Долгова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 928 с.: Режим доступа: http://www.studentlibrary.ru
3. Клиническая лабораторная диагностика. В 2 томах. Том 2 [Электронный ресурс]: национальное руководство / под ред. В.В. Долгова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 808 с.: Режим доступа: http://www.studentlibrary.ru

Дополнительная

1. Кишкун, А.А. Клиническая лабораторная диагностика [Текст]: учебное пособие / А.А. Кишкун. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 976 с.
2. Кишкун, А. А. Клиническая лабораторная диагностика [Электронный ресурс]: учебное пособие / А.А. Кишкун – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 976 с. : Режим доступа : http://www.studentlibrary.ru.
3. Кишкун, А.А. Назначение и клиническая интерпретация результатов лабораторных исследований [Электронный ресурс] / А.А. Кишкун – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 448 с.: Режим доступа: http://ezproxy.ssmu.ru:2063/book/ISBN9785970438732.html
4. Современные технологии лабораторной медицины [Текст]: учебное пособие для студентов, обучающихся по специальностям 060112 – медицинская биохимия, 060113 – медицинская биофизика, 060114 – медицинская кибернетика / Н.В. Рязанцева [и др.]. – Томск, СибГМУ: Печатная мануфактура, 2008. – 360 с.

5. Современные технологии лабораторной медицины [Электронный ресурс] : учебное пособие для студентов, обучающихся по специальностям 060112 - медицинская биохимия, 060113 - медицинская биофизика, 060114 - медицинская кибернетика / Н. В. Рязанцева [и др.]; Сибирский медицинский университет (Томск). – Электрон. текстовые дан. – Томск: Печатная мануфактура, 2008. – 360 с.: Режим доступа:http://irbis64.medlib.tomsk.ru
6. Клиническая биохимия [Текст]: учебное пособие для студентов медицинских вузов / ред. В. А. Ткачук. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 512 с.
7. Клиническая биохимия [Электронный ресурс] : учебное пособие / ред. В. А. Ткачук. - Электрон. текстовые дан. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 264 с. : Режим доступа: http://www.studentlibrary.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСКАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ СМЕЩЕНИЯ *B* И КОЭФФИЦИЕНТА ВАРИАЦИИ *CV* ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В КОНТРОЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Исследование биологических жидкостей	B_{10}, %	CV_{10}, %	B_{20}, %	CV_{20}, %
Исследование уровня аланинтрансаминазы* в крови	±17	16	±15	15
Исследование уровня альбумина в крови	±5	4	±4	4
Исследование уровня амилазы* в крови	±16	11	±15	10
Исследование уровня аспартатрансаминазы* в крови	±11	11	±10	10
Исследование уровня общего белка в крови	±5	3	±5	3
Исследование уровня общего билирубина в крови	±17	16	±15	15
Исследование уровня γ-глутамилтрансферазы в крови	±16	11	±15	10
Исследование уровня глюкозы в крови	±6	5	±5	5
Исследование уровня железа в крови	±12	17	±10	16
Исследование уровня калия в крови	±5	4	±4	4
Исследование уровня кальция в крови	±3,4	3,3	±3,0	3,0
Исследование уровня креатинина в крови	±11	8	±10	7
Исследование уровня креатинкиназы* в крови	±23	22	±20	20
Исследование уровня лактатдегидрогеназы* и ее изоферментов в крови	±11	11	±10	10
Исследование уровня магния в крови	±7	7	±6	6
Исследование уровня мочевой кислоты в крови	±11	8	±10	7
Исследование уровня мочевины в крови	±11	11	±10	10
Исследование уровня натрия в крови	±1,8	2,2	±1,5	2,0
Исследование уровня триглицеридов плазмы крови	±17	16	±15	15
Исследование уровня фосфатов (неорганических) в крови	±8	8	±7	7
Исследование уровня хлоридов в крови	±3,4	3,3	±3,0	3,0
Исследование уровня холестерина в крови	±9	8	±8	7
Исследование уровня щелочной фосфатазы* в крови	±16	11	±15	10
Определение белка в моче	±24	27	±20	25
Исследование уровня глюкозы в моче	±22	16	±20	15
Исследование уровня общего гемоглобина в в крови	±5	4	±4	4
Исследование уровня эритроцитов в крови	±7	4	±6	4
*Обозначения даны в соответствии с отраслевым классификатором простых медицинских услуг				

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений 3

Введение 4

РАЗДЕЛ 1. Клиническая лабораторная диагностика: основные понятия и менеджмент качества клинических лабораторных исследований 5
Тема 1.1. Ключевые понятия клинической лабораторной диагностики. Лабораторная аналитика. Основы контроля качества лабораторных исследований 5

РАЗДЕЛ 2. Химико-микроскопические исследования биологических материалов 13
Тема 2.1. Исследование мочи 13
Тема 2.2. Исследование кала 23
Тема 2.3. Исследование спинномозговой жидкости 35
Тема 2.4. Исследование мокроты 46

РАЗДЕЛ 3. Биохимические и иммунологические методы исследования в клинической медицине 53
Тема 3.1. Лабораторные исследования показателей обмена липидов и их клинико-диагностическое значение 53
Тема 3.2. Клинико-лабораторная диагностика инфаркта миокарда 62
Тема 3.3. Основы лабораторной диагностики нарушений углеводного обмена 67
Тема 3.4. Лабораторные показатели синдрома воспаления 73

РАЗДЕЛ 4. Лабораторная диагностика неотложных состояний 82
Тема 4.1. Лабораторная диагностика неотложных состояний: алгоритмы, методы лабораторного анализа нарушений водно-электролитного обмена и кислотно-основного состояния (семинар) 82

РАЗДЕЛ 5. Алгоритмы и современные технологии лабораторных исследований при органных патологиях 85
Тема 5.1. Клинико-лабораторная диагностика заболеваний почек 85
Тема 5.2. Алгоритмы лабораторных исследований заболеваний печени 92

Тема 5.3. Лабораторная диагностика заболеваний поджелудочной железы 97
Тема 5.4. Лабораторные методы исследования желудочной секреции и дуоденального содержимого..... 104
Тема 5.5. Особенности лабораторной диагностики эндокринных нарушений 109

Тестовые задания..... 114

Ситуационные задачи 124

Эталоны ответов к тестовым заданиям..... 127

Эталоны ответов к ситуационным задачам 128

Вопросы для подготовки к зачету 130

Рекомендуемая литература..... 134

Приложение 136

Учебное издание

Анна Алексеевна Садыкова
Елена Алексеевна Степовая
Евгения Викторовна Шахристова
Ольга Леонидовна Носарева
Денис Александрович Дьяков

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ

для студентов медико-биологического факультета

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

В 2-х частях. Часть 1

Редактор Коломийцев А.Ю.
Технический редактор Коломийцева О.В.
Обложка Гончаров С.Б.

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. 8 (3822) 51-41-53
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 25.08.2020 г.
Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. лист. 8,7. Авт. лист. 5,3.
Тираж 100 экз. Заказ № 19

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru