

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ для обучающихся
по освоению дисциплины**

Б1.В.17 Методы лабораторной диагностики

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	4
1.1. Лекция № 1-2 История и основные направления развития лабораторной диагностики. Основы теории лабораторной информации	4
1.2. Лекция № 3 Аналитическая оценка лабораторного теста. Определение доверительных вероятностей и уровней значимости	8
1.3. Лекция № 4 Нозологическая оценка лабораторного теста. Определение диагностической чувствительности и специфичности	11
1.4. Лекция № 5 Нозологическая оценка лабораторного теста. Определение прогностической ценности положительного результата и прогностической ценности отрицательного результата	15
1.5. Лекция № 6 Общепатологические процессы. Воспаление	17
1.6. Лекция № 7-8 Гемопоэз и его регуляция	23
1.7. Лекция № 9 Общеклинический анализ крови. Лейкограмма	28
1.8. Лекция № 10 Оценка результатов определения биохимических показателей крови при основных формах патологии и их интерпретация	32
1.9. Лекция № 11 Определение показателей иммунного статуса: иммуноглобулины G, A и M в сыворотке, Т- и В-лимфоциты	42
1.10. Лекция № 12 Оценка иммунного статуса	47
1.11 Лекция № 13 Бактериологический метод микробиологической диагностики	50
2. Темы лабораторных работ	54
2.1 Лабораторная работа № ЛР-1 Нозологическая оценка лабораторного теста. Определение диагностической чувствительности и специфичности	54
2.2 Лабораторная работа № ЛР-2 Определение показателей общеклинического анализа крови: гемоглобин, количество эритроцитов, гематокрит	61
2.3 Лабораторная работа № ЛР-3 Определение расчетных показателей общеклинического анализа крови: цветной показатель, кривая Прайс-Джонса, среднее содержание гемоглобина в одном эритроците	64
2.4 Лабораторная работа № ЛР-4 Приготовление мазка крови для определения лейкограммы, её оценка	67
2.5 Лабораторная работа № ЛР-5 Определение групп крови человека с помощью поликлонов А и В	73
2.6 Лабораторная работа № ЛР-6 Определение резус-фактора в крови человека с помощью антирезусной сыворотки	75
2.7 Лабораторная работа № ЛР-7 Определение физических показателей общеклинического анализа мочи: объем, цвет, прозрачность, плотность и др.	76
2.8 Лабораторная работа № ЛР-8 Определение химических показателей общеклинического анализа мочи: pH, белок, нитриты, глюкоза, кетоновые тела, билирубин и уробилиноген	78
2.9 Лабораторная работа № ЛР-9 Определение микроскопических показателей общеклинического анализа мочи: клеточные и неклеточные элементы осадка мочи	81
2.10 Лабораторная работа № ЛР-10 Оценка результатов определения общеклинического анализа мочи при основных формах патологии почек и	84

мочевыводящих путей и их интерпретация	
2.11 Лабораторная работа № ЛР-11 Проведение микроскопического и иммуноферментного экспресс-методов микробиологической диагностики	94
2.12 Лабораторная работа № ЛР-12 Биологический метод микробиологической диагностики	100
2.13 Лабораторная работа № ЛР-13 Серологический метод микробиологической диагностики	102

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция № 1-2 (4 часа).

Тема: «История и основные направления развития лабораторной диагностики. Основы теории лабораторной информации»

1.1.1 Вопросы лекции:

- 1.1. Введение. Определение и основные понятия.
- 1.2. Подготовка врачей клинической лабораторной диагностики.
- 1.3. Подготовка специалистов с высшим немедицинским образованием для работы в КДЛ.

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Введение. Определение и основные понятия.

Концепция развития службы клинической лабораторной диагностики Министерства здравоохранения Российской Федерации (далее - "Концепция") представляет собой комплекс организационных, экономических и образовательных мероприятий, направленных на повышение уровня оказания медицинской помощи населению Российской Федерации за счет повышения качества клинической лабораторной диагностики, рационального и эффективного использования ресурсов, внедрения новой техники и технологий, повышения требований к специалистам службы и развития новых форм хозяйствования. Клиническая лабораторная диагностика практического здравоохранения России сегодня требует целого ряда изменений и установок. Провести достаточно серьезную реорганизацию и корректировку ее отдельных разделов необходимо с учетом максимально возможных экономических затрат, связанных с переоснащением клинико-диагностических лабораторий, при одновременном повышении ее диагностической эффективности.

Концепция разработана в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации и резолюцией "Совещания главных специалистов по клинической лабораторной диагностике" субъектов РФ от 17.04.2002 г.

На каждом этапе реализации Концепции, а также по мере изменения социально-экономических и законодательных условий Министерство здравоохранения вправе вносить в Концепцию соответствующие корректировки и дополнения.

Определение и основные понятия

Клиническая лабораторная диагностика (лабораторная диагностика) представляет собой медицинскую диагностическую специальность, состоящую из совокупности исследований *in vitro* биоматериала человеческого организма, основанных на использовании гематологических, общеклинических, паразитарных, биохимических,

иммунологических, серологических, молекулярно-биологических, бактериологических, генетических, цитологических, токсикологических, вирусологических методов, сопоставления результатов этих методов с клиническими данными и формулирования лабораторного заключения. Прогресс в области фундаментальных исследований и внедрение их результатов в практику предопределяет углубление содержания и расширение границ клинической лабораторной диагностики в будущем. Основной задачей и условием развития специальности является получение объективных данных о состоянии здоровья и нездоровья отдельно взятого пациента, выделенной группы или населения региона в целом. Получение достоверной лабораторной информации, включая мониторинг эффективности лечения больных, может быть реализовано на основе современных лабораторных технологий и последующего эффективного клинического использования полученных результатов.

Основу клинической лабораторной диагностики составляют медицинские технологии, каждая из которых, пройдя научную апробацию и процедуру разрешения на применение, требует специфических методических рекомендаций, рабочего места,

санитарных правил, технического контроля, подготовки персонала, экономического обоснования и пр.

Реализация технологий клинической лабораторной диагностики осуществляется в рамках единой службы, включающей подразделения гематологической, общеклинической, паразитарной, биохимической, иммунологической, молекулярно-биологической, бактериологической, генетической, цитологической, токсикологической, вирусологической диагностики. Диагностика по этим направлениям проводится в клинико-диагностических лабораториях (КДЛ) стационаров, поликлиник, лабораториях при отделениях интенсивной терапии, реанимации, искусственной почки и др., а также в централизованных и специализированных лабораториях. Допустимо службу клинической лабораторной диагностики воспринимать как индустрию оказания медицинских услуг, конструкция которой должна быть подчинена общей концепции развития здравоохранения и ее диагностической доктрине. Речь идет о последовательной структуризации высокотехнологического производства, включающего клинически и экономически обоснованные операции с соответствующими организационными решениями, штатным и материальным оснащением, унифицированной документацией.

Наиболее сложными проблема клинической лабораторной диагностики являются: подготовка и закрепление квалифицированных кадров в лабораторной службе повышение образованности врачей клинических специальностей в области лабораторной диагностики.

2. Подготовка врачей клинической лабораторной диагностики. Подготовка врачебных кадров для клинической лабораторной диагностики проводится на последипломном этапе достаточно активно. За последнее время введены интернатура, ординатура и аспирантура по клинической лабораторной диагностике, ведется профессиональная переподготовка. Эти виды обучения дают право сдавать экзамен для получения сертификата специалиста по лабораторной диагностике. В стране действует широкая сеть специализированных кафедр клинической лабораторной диагностики, работающих в ГИДувах и ФУВах медицинских институтов. С введением обязательной сертификации специалистов и ухудшением финансовых возможностей учреждений здравоохранения для направления врачей на учебу резко увеличилась активность по открытию новых кафедр. Часто основная цель таких кафедр - выдача сертификатов, причем исключительно на хозрасчетной основе. Кафедры порою возглавляются заведующими, не имеющими опыта работы по специальности, часто лицами без медицинского образования, кафедры не имеют помещений, оборудования, занятия проводятся по доморощенным программам. В связи с этим представляется актуальным введение процедуры лицензирования органами Министерства здравоохранения учебных заведений, готовящих врачей и проводящих профессиональную переподготовку с выдачей сертификатов специалистов. Проблемы первичной специализации и усовершенствования врачей клинической лабораторной диагностики с каждым годом приобретают все более острый характер. Первичная специализация врачей по-прежнему частично осуществляется на краткосрочных курсах, продолжительностью 4-5 мес. Очевидно, что краткосрочные циклы первичной специализации не могут обеспечить достаточного уровня подготовки для самостоятельной работы врача, тем более в области "высоких технологий". Вместе с тем, сохранение структуры цикла первичной специализации как составной части программы переподготовки кадров клинической лабораторной диагностики является исключительно важной задачей на ближайшие годы. Эта форма переподготовки показала свою эффективность при перепрофилировании научных сотрудников, врачей других специальностей, имеющих определенный опыт клинической работы. Кроме того, следует учитывать, что потребности лабораторной службы во врачах клинической лабораторной диагностики (незаполненные вакансии) составляют только по системе Минздрава порядка 15 тысяч человек, не включая ведомственные, частные учреждения здравоохранения. Существующие в настоящее время условия подготовки

интернов и ординаторов не смогут обеспечить требуемый поток подготовки врачей клинической лабораторной диагностики. Сложной является проблема практической подготовки клинических ординаторов. Число клинических баз, на которых удается достигнуть оптимального сочетания высокой квалификации врачебного и среднего медицинского персонала, современного оборудования и правильной организации работы ограничено даже в масштабах крупных городов. Создание новых и всестороннее развитие существующих клинических баз подготовки ординаторов, совместное использование их несколькими кафедрами для получения максимального педагогического эффекта является еще одной важной задачей на ближайший период времени. Сегодня должна быть поставлена цель - перейти к подготовке врачей клинической лабораторной диагностики исключительно в рамках клинической ординатуры. Минимальный ее срок составляет два года, максимальный - четыре года. Такой переход потребует решения ряда проблем, а именно: Подготовка профессорско-преподавательского состава кафедр клинической лабораторной диагностики к новым формам обучения, Материально-техническое оснащение кафедр, Подготовка клинических баз для обучения ординаторов. Разработка современных унифицированных программ последипломной подготовки в клинической ординатуре с учетом современных требований. Повышение мотивации обучения в ординатуре, вплоть до выдачи специального разрешения для работы на коммерческих условиях, повышение стипендии ординаторам и аспирантам. Ввиду комплексного характера клинической лабораторной диагностики невозможно циклы общего усовершенствования проводить по всем направлениям специальности. Практически при проведении 1-2-месячных циклов усовершенствования ведется подготовка по разделами или субдисциплинами, перечисленным выше. В этой связи повышением квалификации занимаются узкопрофильные кафедры. В период введения процедуры сертификации специалистов эти кафедры имели право выдавать сертификаты по клинической лабораторной диагностике. Это положение следует закрепить законодательно, предоставив кафедрам, работающим по конкретным разделам специальности, иметь право после циклов тематического усовершенствования продолжительностью не менее 1 месяца подтверждать сертификат специалиста клинической лабораторной диагностики. Соответственно врачи клинической лабораторной диагностики должны иметь право проходить усовершенствование, после которого они могут сдавать сертификационный экзамен, по определенным строго оговоренным разделам клинической лабораторной диагностики, например клиническая биохимия, цитология, иммунология, молекулярно-биологические исследования и т.д. Перечень таких разделов (субдисциплин) клинической лабораторной диагностики должен быть узаконен, зачисляться на такие циклы усовершенствования должны только те врачи клинической лабораторной диагностики, которые прошли обучение в интернатуре, ординатуре, аспирантуре и имеют сертификат (диплом) врача клинической лабораторной диагностики. Серьезному пересмотру должна быть подвергнута система усовершенствования врачей клинической лабораторной диагностики. Полностью отсутствуют законодательные побудительные мотивы к самообразованию, повышению своих профессиональных знаний и умений в промежутке между циклами усовершенствования. Как следствие, для многих специалистов становятся лишней обузой участие в заседаниях научного общества, семинарах и конференциях, написании статей и выступлениях с научными докладами, подписка и изучение научных журналов по специальности. Месячные циклы один раз в пять лет не могут восполнить пробелов непрерывного самообразования. С каждым годом эта проблема становится все более актуальной в связи с быстрыми технологическими преобразованиями в клинической лабораторной диагностике, внедрением новых методов и методик, изменениями экономических и правовых условий работы.

Для повышения эффективности образовательного процесса ближайшими задачами являются:

•Создание учебника по клинической лабораторной диагностике и разработка учебных пособий по наиболее актуальным разделам лабораторной службы.

•Внедрение новых образовательных технологий (телемедицина, интернет-технологии и др.)

3. Подготовка специалистов с высшим немедицинским образованием для работы в КДЛ.

В связи с введением должности биолога в КДЛ и увеличением доли и сложности аналитической работы необходимо законодательно утвердить систему подготовки таких специалистов. В настоящее время действует положение о допуске на должность биолога выпускников биологических факультетов университетов. Ранее в университетах целенаправленно не велась подготовка специалистов для КДЛ. При постановке унифицированных традиционных методов общей подготовки биологов по аналитическим дисциплинам было достаточным для освоения большинства методов, использованных в КДЛ. В настоящее время требования к аналитической компоненте при выполнении лабораторных исследований существенно увеличились, происходит переориентация этой компоненты на достижение требуемой точности. В некоторых университетах (Воронеж, Сургут) открыты специализированные курсы для подготовки специалистов для КДЛ. В этих университетах ведется 3-4-летнее обучение по утвержденным программам. Студенты проходят подготовку на базовых клинико-диагностических лабораториях, занятия с ними ведут специалисты, работающие в практических лабораториях учреждений здравоохранения. Тем не менее, как специалисты без медицинского образования они не имеют возможности обучаться в интернатуре или ординатуре. Необходимо законодательно приравнять диплом биолога к сертификату специалиста при приеме на

должность биолога. Однако порядок прохождения повышения квалификации для биологов клинико-диагностических лабораторий необходимо не только сохранить, но желательно увеличить, включив в программу их подготовки медицинские аспекты в объемах, необходимых этим специалистам для выполнения профессиональных обязанностей. Научное общество клинической лабораторной диагностики России является наиболее представительным, оно имеет отделения практически во всех регионах, ежегодно проводит "Национальные дни лабораторной медицины России", несколько конференций и симпозиумов, периодически собирает съезды общества. Представители общества представлены практически во всех профильных международных научных организациях, общество издает профессиональные научные журналы, руководства, монографии, учебные пособия по лабораторной службе.

Несмотря на то, что в состав клинической лабораторной диагностики входят исследования по фундаментальным направлениям теоретической медицины, тем не менее, комплексный характер исследований, клиническая направленность, методический подход, связанный с исследованиями *in vitro* биологического материала человека, создали базу для выделения клинической лабораторной диагностики в качестве самостоятельной научной дисциплины. Формальное признание клинической лабораторной диагностики как науки состоит:

в создании секции лабораторной диагностики Ученого Совета Министерства здравоохранения РФ,

открытии Ученых советов по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальности 14.00.46 - клиническая лабораторная диагностика,

проведении ежегодных научных конференций по специальности под эгидой Научного общества клинической лабораторной диагностики,

издании периодических научно-практических журналов "Клиническая лабораторная диагностика", "Лаборатория",

активном функционировании научно-методического центра по клинической лабораторной диагностике

Научные разработки в сфере лабораторной диагностики имеют в значительной мере прикладную направленность. Используя достижения фундаментальных наук, клиническая лабораторная диагностика адаптирует эти достижения в систему здравоохранения, привлекая к научным исследованиям широкую сеть клинико-диагностических и научно-исследовательских лабораторий, оснащенных высокотехнологичной диагностической аппаратурой, в которых работают высококвалифицированные специалисты. Как прикладная отрасль, лабораторная диагностика широко комплексируется с клиническими подразделениями, обеспечивая их данными о состоянии пациентов, протекающих физиологических и патологических процессах в организме, действии лекарственных препаратов, другой объективной информацией.

В свою очередь необходимо повысить роль научных центров и НИИ в разработке и внедрении в лабораторную службу эффективных, экономически выгодных, доступных для использования при работе с населением технологий. Актуальной задачей является постановка вопроса о признании Российской Академией Медицинских Наук клинической лабораторной диагностики в качестве медицинской науки и открытие вакансий на выборы членов-корреспондентов, а в последующем действительных членов РАМН по клинической лабораторной диагностике.

Отечественная служба клинической лабораторной диагностики имеет большие потенциальные возможности для развития в условиях реформирования всей системы здравоохранения и современных технологических преобразований. Накопившийся за последние годы груз организационных, материально-технических и профессиональных проблем требует незамедлительного решения. Дальнейшее затягивание этого процесса может привести к серьезным и подчас непоправимым последствиям. Усилия по преодолению создавшегося положения должны быть продуманными, согласованными и ориентированными на перспективу.

1. 2 Лекция № 3 (2 часа).

Тема: «Аналитическая оценка лабораторного теста. Определение доверительных вероятностей и уровней значимости».

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Технология оценки результатов лабораторных исследований
2. Критерии оценки результатов лабораторных исследований
3. Уровни доверительной вероятности и значимости.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Технология оценки результатов лабораторных исследований. Клинический ординатор должен знать, понимать и учитывать влияние на результаты анализов условий взятия, хранения, транспортировки проб биоматериала; биологической, аналитической и ятогенной вариаций. Однако его важнейшая обязанность - учет влияния патологических факторов, определяющих отклонение результатов лабораторных исследований за пределы «нормальных величин», или референтных интервалов, т.е. собственно анализ патологической вариации на нозологическом уровне оценки лабораторного результата. Для того чтобы делать выводы по данным патологических результатов лабораторных исследований на нозологическом уровне, клиницисту необходимо иметь дополнительную информацию об особенностях этих тестов у пациентов различных групп. В частности, необходимо иметь данные о степени патогномоничности изменения величины лабораторного показателя для той или иной патологии, о чувствительности, специфичности и прогностической ценности лабораторного теста. Кроме того, необходимо знать критические величины результатов лабораторных тестов, требующие немедленных действий врача.

2. Критерии оценки результатов лабораторных исследований.

Критерии	Болезнь есть	Болезни нет
Тест положительный	A — истинно положительный	B — ложноположительный
Тест отрицательный	C — ложноотрицательный	D — истинно отрицательный
Диагностическая чувствительность	A/(A+C) — доля истинно положительных тестов среди больных	
Диагностическая специфичность	D/(B+D) — доля истинно отрицательных тестов среди здоровых	
Предсказательная ценность положительного теста (ПЦП)	A/(A+B) — доля истинно положительных тестов среди всех положительных тестов	
Предсказательная ценность отрицательного теста (ПЦО)	D/(C+D) — доля истинно отрицательных тестов среди всех отрицательных тестов	

Проанализируем, как могут быть использованы эти критерии у больных с инфарктом миокарда (ИМ). Диагностическая чувствительность теста определяет вероятность положительного результата и показывает, с какой степенью уверенности можно ожидать положительный результат теста у больных:

$$\text{Диагностическая чувствительность} = \frac{\text{Количество больных с ИМ, имеющих положительный результат теста}}{\text{Количество больных с ИМ}},$$

$$\text{Диагностическая специфичность} = \frac{\text{Количество больных с ИМ, имеющих отрицательный результат теста}}{\text{Количество всех протестированных пациентов без ИМ}}$$

Клиницист должен понимать, что диагностическая чувствительность и специфичность теста зависят от величины референтного диапазона, т.е. выбора точки разделения («cut-off»), при использовании которой любую величину результата теста выше этой точки рассматривают как патологию. Клинические цели могут влиять на выбор точки «cut-off». Если взять за позицию «cut-off» точку «A», то тест будет иметь 100%-ную чувствительность в отношении болезни и очень низкую специфичность. В случае если в качестве «cut-off» будет выбрана точка «C», то тест будет иметь 100%-ную специфичность, но очень низкую чувствительность. По этой причине для большинства тестов точку «cut-off» (точку «B») определяют референтным диапазоном, т.е. диапазоном результатов теста, которые располагаются в диапазоне $\pm 2S$ при средней величине «B». В некоторых случаях величину «cut-off» изменяют, в зависимости от целей исследования, что увеличивает или чувствительность, или специфичность.

3. Уровни доверительной вероятности и значимости. Доверительная вероятность или надежность P - это вероятность того, что истинное значение средней генеральной совокупности X попадает в интервал $M-t_p m < x < M+t_p m$. Как правило, минимально допустимая доверительная вероятность, рекомендуемая при определении доверительных интервалов в биологических исследованиях, равна 95% ($P=0,95$ или $p=1-0,95=0,05$). Другими словами доверительная вероятность обратно пропорциональна уровню значимости оценок измерений, которая в свою очередь равна ее относительной погрешности. Величина вероятной ошибки не должна превышать величины заданной

надежности для проведения данного исследования. Чем выше требования к вероятности вывода, тем шире должен быть интервал, который может обеспечить ее достоверность. Выбор величины доверительной вероятности является отправной точкой планирования эксперимента. Установив в ходе поискового опыта основные статистические величины изучаемых явлений, как то среднеарифметическую, среднеквадратическое отклонение и др., можно приступать к планированию эксперимента. В настоящее время применяются три степени вероятности того, что заключение о границах, вмещающих все распределения, будет достоверным. Для удобства работы применяют "круглые" числа: 1 уровень - 95% 2 уровень - 99% 3 уровень - 99,9%. В этих случаях границы доверительного интервала составляют соответственно: $\pm 1,96S$ $\pm 2,58S$ $\pm 3,30S$. Обычно значения показателей вероятности обозначаются через P (Probability), соответственно чему делаются записи при указании уровней вероятности или уровней значимости: $P^3 0,95$ или $P < 0,05$ $P^3 0,99$ или $P < 0,01$ $P^3 0,999$ или $P < 0,001$. Определенному значению вероятности соответствует уровень значимости. Так, вероятности 0,95 (95%) соответствует уровень значимости 0,05 (5%), вероятности 0,99 (99%) - уровень значимости 0,01 (1%). Уровень значимости показывает, с какой вероятностью возможна ошибка в результатах опыта. В научных публикациях при оценке достоверности результата может указываться или уровень вероятности, или уровень значимости. Первый уровень вероятности, соответствующий 95% доверительному интервалу ($P^3 0,95$), считается достаточно надежным для оценки результатов большинства биологических исследований (общая биология, цитология, физиология, генетика, ботаника, зоология, зоотехния, ветеринария, медицина). В этом случае t уровень равен 1,96, выборочная средняя от генеральной отличается не более чем на 2. Вероятность ошибки 1:20 считается допустимой. Большую вероятность ошибки, как, например, 1:10 при $P^3 0,90$, в этих исследованиях допускать не следует.

Второй уровень вероятности в 99% ($P^3 0,99$) требуется в экономических исследованиях, связанных с затратами труда и денежных средств. В этом случае допускается возможность ошибки 1:100, $t=2,58$, выборочная средняя отличается от генеральной не более чем на 2,58 \times . Этот уровень вероятности применяется также при повторных биологических исследованиях, если предшествующие эксперименты вызывают сомнения и требуют уточнения.

Третий уровень вероятности $P^3 0,999$, соответствующий 99,9% уровню вероятности безошибочного суждения, отвечает самым высоким требованиям надежности результатов эксперимента. В этом случае возможность ошибки составляет всего лишь 1:1000. Такая высокая степень вероятности требуется при особо ответственных работах, а именно: в экспериментах с вредными и ядовитыми веществами, при проверке спорных теоретических вопросов и др.

Статистическая совокупность — группа, состоящая из множества относительно однородных элементов, взятых вместе в известных границах пространства и времени и обладающих признаками сходства и различия. Свойства статистической совокупности: 1) однородность единиц наблюдения 2) определенные границы пространства и времени изучаемого явления. Объектом статистического исследования в медицине и здравоохранении могут быть различные контингенты населения (население в целом или его отдельные группы, больные, умершие, родившиеся), лечебно-профилактические учреждения и др. Статистическая совокупность состоит из отдельных, единичных наблюдений. Единица наблюдения — каждый первичный элемент, составляющий статистическую совокупность и являющийся носителем признаков, подлежащих учету. Единица наблюдения определяется целью и задачами статистического исследования, а также избранным объектом изучения (при изучении больничной летальности единицей наблюдения будет больной, умерший в стационаре). Единицы наблюдения имеют признаки сходства и различия. Признаки сходства служат Основанием для объединения единиц наблюдения в совокупность. Признаки, по которым различаются элементы

статистической совокупности, подлежат регистрации и называются Учетными признаками, которые могут быть:

А) Качественными (атрибутивные, описательные: пол, профессия, нозологическая форма заболевания) и Количественными (выражены числом: масса тела, рост, возраст, продолжительность болезни).

Б) по роли в изучаемой совокупности — Факторные (признаки, под влиянием которых изменяются другие, за висящие от них признаки) и Результативные (признаки, зависящие от факторных). С изменением величины факторного признака происходит изменение результативного (с увеличением возраста ребенка увеличивается его рост).

1. 3 Лекция № 4 (2 часа).

Тема: «Нозологическая оценка лабораторного теста. Определение диагностической чувствительности и специфичности»

1.3.1 Вопросы лекции:

- 1.1 Нозологический уровень оценки результатов лабораторных исследований.
- 1.2 Основные характеристики лабораторного теста.
- 1.3 Определение диагностической чувствительности и специфичности.

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Нозологический уровень оценки результатов лабораторных исследований. Под оценкой результатов лабораторных исследований на нозологическом уровне подразумеваю определение связи обнаруженных отклонений в анализах с определенной патологией. Степень патогномоничности лабораторных отклонений весьма вариабельна, так как формы и выраженность самого патологического процесса существенно различны от одного случая заболевания к другому. Некоторые лабораторные тесты носят практически избирательный характер, будучи тесно связаны с определенной функцией органа, ткани, организма, нарушенной патологическим процессом. Очень высока частота выявления в крови повышенной концентрации тропонинов Т и I при развитии инфаркта миокарда, поскольку эти белки играют важнейшую роль в функционировании сократительной системы сердечной мышцы. Процесс установления диагноза несовершенен - клиницист может лишь предполагать, что диагноз верен, нежели утверждать это со всей определенностью. Раньше клиницисты выражали степень уверенности в клиническом диагнозе, предваряя его формулировку словами «исключается...» или «возможно...». В настоящее время все чаще эту уверенность в диагнозе выражают через вероятности. По этой причине врач должен понимать статистическую суть диагностической ценности лабораторных тестов в различных ситуациях. Как правило, это помогает врачу уменьшить степень неопределенности диагноза с помощью того или иного результата лабораторного теста; в ряде случаев убедиться в его неопределенности, а иногда - лишь осознать степень своей неуверенности в диагнозе. Результат теста может быть либо положительным (патология), либо отрицательным (норма), а заболевание может либо быть, либо отсутствовать. Возможны четыре варианта толкования результатов теста - два истинных и два ложных. Правильный ответ - положительный результат при наличии заболевания или отрицательный в его отсутствие. Напротив, ответ ошибочный, если результат теста положителен (ложноположительный) хотя человек здоров, или отрицателен (ложноотрицательный), хотя человек болен. Основные характеристики лабораторного теста - их диагностическая чувствительность и специфичность. Вероятность положительного результата диагностического теста в присутствии болезни называют чувствительностью метода, а вероятность отрицательного результата в отсутствии болезни - его специфичностью. Чувствительный тест редко «пропускает» пациентов, у которых имеется заболевание. Специфический тест, как правило, «не относит» здоровых людей к категории больных.

Практически эти характеристики лабораторных тестов определяют на основании статистического анализа массивов результатов клинико-лабораторных исследований и математически характеризуют интегральное влияние патогномоничности лабораторного показателя для определенной формы патологии. В основу расчетов берут распределение результатов исследований в соответствии с данными, приведенными в таблице. В большинстве случаев эти характеристики совпадают, будучи истинно положительными (болезнь есть, и тест ее подтверждает) или истинно отрицательными (болезни нет, и тест ее исключает).

Для врача-клинициста чувствительный тест особенно информативен в том случае, когда он дает отрицательный результат (т.е. из больных исключает здоровых), а специфический тест наиболее эффективен, когда дает положительный результат (т.е. выявляет больных среди здоровых). По этой причине чувствительные тесты рекомендуют применять на ранних стадиях диагностического поиска для сужения его рамок, когда возможных вариантов много, и диагностические тесты позволяют исключить некоторые, т.е. сделать вывод, что эти заболевания маловероятны. Специфические тесты нужны для подтверждения (установления) диагноза, предположенного на основании других данных. Высокоспецифический тест не должен давать положительного результата при отсутствии заболевания. Такие тесты необходимо применять, если ложноположительный результат может нанести пациенту вред. Например, прежде чем назначать пациенту со злокачественным новообразованием химиотерапию, сопряженную с риском, эмоциональной травмой, необходимо морфологическое подтверждение диагноза, так как результаты повышения уровня онкомаркеров и данные других методов исследования недостаточны.

2. Основные характеристики лабораторного теста. Основные характеристики лабораторного теста — его диагностическая чувствительность и специфичность. Вероятность положительного результата диагностического теста в присутствии болезни называется чувствительностью метода, а вероятность отрицательного результата в отсутствие болезни — его специфичностью. Чувствительный тест редко «пропускает» пациентов, у которых есть заболевание. Специфический тест, как правило, «не относит» здоровых людей к категории больных. Практически эти характеристики лабораторных тестов определяют на основании статистического анализа массивов результатов клинико-лабораторных исследований и математически характеризуют интегральное влияние патогномоничности лабораторного показателя для определённой формы патологии. В основу расчётов берут распределение результатов исследований в соответствии с данными, приведёнными в табл.. В большинстве случаев эти характеристики совпадают, будучи истинноположительными (болезнь есть и тест её подтверждает) или истинноотрицательными (болезни нет и тест её исключает). Однако результаты могут быть и ложноотрицательными (болезнь есть, но тест её исключает), и ложноположительными (болезни нет, но тест её подтверждает). Для клинициста чувствительный тест особенно информативен в том случае, когда его результат отрицателен (то есть из больных исключает здоровых), а специфический тест наиболее эффективен, когда его результат положителен (то есть выявляет больных среди здоровых). Поэтому чувствительные тесты рекомендуют применять на ранних стадиях диагностического поиска для сужения его рамок, когда возможных вариантов много и диагностические тесты позволяют исключить некоторые, то есть сделать вывод, что эти заболевания маловероятны. Специфические тесты нужны для подтверждения (установления) диагноза, предположенного на основании других данных. Результаты высокоспецифического теста не должны быть положительными в отсутствие заболевания. Такие тесты необходимо применять, если ложноположительный результат может нанести пациенту вред. Например, прежде чем назначать пациенту со злокачественным новообразованием химиотерапию, сопряжённую с риском, эмоциональной травмой,

необходимо морфологическое подтверждение диагноза, так как повышение концентрации маркёров опухоли и данные других методов исследования недостаточны.

3. Определение диагностической чувствительности и специфичности.

Клиницист должен понимать, что диагностическая чувствительность и специфичность теста зависят от величины референтного диапазона, то есть выбора точки разделения, при использовании которой любая величина результата теста выше этой точки рассматривается как патология. Клинические цели могут влиять на выбор точки разделения. Если взять за позицию разделения точку «А», то тест будет иметь 100% чувствительность по отношению к болезни и очень низкую специфичность. Если использовать с этой целью точку «С», то тест будет иметь 100% специфичность, но очень низкую чувствительность. Поэтому для большинства тестов точка разделения («В») определяется референтным диапазоном, то есть диапазоном результатов теста, располагающихся в диапазоне $+2S$ при средней величине «В». В некоторых случаях величину точки разделения изменяют в зависимости от целей исследования, что увеличивает или чувствительность, или специфичность. Чувствительность и специфичность исследования необходимо учитывать при решении вопроса о том, следует ли назначать данный тест. Однако если тест назначен и получены его результаты (положительные или отрицательные), понятия чувствительности и специфичности теряют смысла. Для клинициста теперь важнейшее значение имеет проблема — как велика вероятность того, что болезнь присутствует на самом деле, если результат теста положительный, или с какой надёжностью можно её исключить, если тест отрицательный. На эти вопросы можно ответить, используя ПЦПР и ПЦОР. ПЦПР — вероятность наличия заболевания при положительном (патологическом) результате теста. ПЦОР — вероятность отсутствия заболевания при отрицательном (нормальном) результате теста. Знание предсказательной ценности (ПЦ) результатов теста позволяет врачу ответить на вопрос: «Какова вероятность того, что данный пациент страдает/не страдает определённым заболеванием, если у него результат теста положителен/отрицателен?» ПЦ теста по отношению к определённой болезни (посттестовая вероятность) зависит не только от его специфичности и чувствительности, но и от распространённости самой болезни. ПЦПР по отношению к определённому заболеванию можно рассчитать по следующей формуле. Распространённость заболевания также называют претестовой вероятностью, то есть это вероятность выявления болезни до того, как стали известны результаты теста. Как оценить претестовую вероятность заболевания у пациента, чтобы вычислить ПЦ того или иного результата теста? Существует несколько источников информации: медицинская литература, архивы медицинских учреждений, личный опыт каждого врача. ПЦ связана с референтной величиной и зависит от соотношения истинных результатов тестов (как положительных, так и отрицательных) и ложных. Чем чувствительнее тест, тем выше ПЦ его отрицательного результата (то есть возрастает уверенность врача, что отрицательные результаты теста отвергают наличие заболевания). Наоборот, чем специфичнее тест, тем выше ПЦ его положительного результата (то есть врач может с большей уверенностью считать, что положительные результаты теста подтверждают предполагаемый диагноз). Поскольку распространённость заболевания влияет на ПЦ теста, последняя неизбежно зависит от условий его применения. Если положительные результаты даже высокоспецифичного лабораторного теста получены в популяции с низкой вероятностью заболевания, то они окажутся преимущественно ложноположительными. Аналогично отрицательные результаты высокоспецифического теста, полученные в популяции с высокими шансами наличия заболевания, скорее всего будут ложно-отрицательными. Таким образом, интерпретация ПЦ положительного или отрицательного результата лабораторного теста меняется в зависимости от распространённости заболевания. Тест с высокой ПЦПР эффективен при обследовании контингента с высокой распространённостью патологии, например для больных в специализированном отделении стационара, тогда как при обследовании амбулаторных

пациентов более полезен тест с высокой ПЦОР. Точно так же влияет на ПЦ теста степень вероятности диагноза (если вероятность диагноза низка, возрастает ценность теста с ПЦОР, если велика — более ценен тест с ПЦПР). Если представить себе популяцию, в которой ни у кого нет рассматриваемого заболевания, то все положительные результаты в такой группе, даже при очень специфичном тесте, будут ложноположительными. Следовательно, когда распространённость заболевания стремится к нулю, ПЦПР теста также стремится к нулю. Наоборот, если данная болезнь есть у каждого в исследуемой популяции, все отрицательные результаты даже высокочувствительного теста окажутся ложноотрицательными. Когда распространённость стремится к 100%, ПЦОР теста стремится к нулю.

Чувствительность и специфичность лабораторных тестов для диагностики острого панкреатита

Лабораторный тест	Чувствительность, %	Специфичность, %
Общая а-амилаза сыворотки крови	83-95	88
Панкреатическая а-амилаза сыворотки крови	92-95	85-93
Липаза сыворотки крови	86-94	96-99
Трипсиноген сыворотки крови	92-100	75-87
Эластаза-1 сыворотки крови	92-100	84-96
Трипсин-антитрипсиновый комплекс сыворотки крови	97-100	87-98
Фосфолипаза сыворотки крови	34-57	75-80
Трипсиноген II мочи	88-98	93-97

Наиболее простой способ расчёта посттестовой вероятности по претестовой вероятности (распространённости заболевания) и ОП — использование номограммы . Необходимо поместить линейку так, чтобы её край прошёл через точки, соответствующие величине претестовой вероятности и ОП, и отметить точку пересечения с линией посттестовой вероятности. Посттестовую вероятность также можно рассчитать по следующей формуле: посттестовые шансы = претестовые шансы x ОП.

Для использования приведённой формулы вероятности следует перевести в шансы. Шансы и вероятность (претестовая или посттестовая) содержат одну и ту же информацию, но по-разному выражают её. В дальнейшем, зная претестовые шансы и ОППР/ОПОР, путём их перемножения можно получить посттестовые шансы наличия болезни, если тест положительный / отрицательный. Например, врач предполагает, что у пациента вероятность ИМ составляет 60% (претестовые шансы 3:2), а активность МВ-фракции КК (КК-МВ) в сыворотке крови повышена (положительный тест). В табл. находим ОППР и ОПОР исследования КК-МВ — 32 и 0,05 соответственно. Посттестовые шансы наличия ИМ составят: при положительном результате — $3 / 2 \times 32 = 48 / 1$ [посттестовая вероятность — $(48 / 1) / (48 / 1) + 1 = 0,98$ или 98%]; при отрицательном результате — $3 / 2 \times 0,05 = 0,15 / 2$ [посттестовая вероятность — $(0,15 / 2) / (0,15 / 2) + 1 = 0,07$ или 7%]. Главное преимущество ОП состоит в том, что они помогают выйти за рамки грубой оценки результатов лабораторного теста (либо норма, либо патология), с которой сталкивается клиницист, если оценивает точность диагностического теста, используя только понятия чувствительности и специфичности при единственной точке разделения. Однако для большинства лабораторных тестов достичь этого не удается. В подобных ситуациях положение точки разделения на непрерывном переходе между нормой и патологией устанавливают произвольно.

1. 4 Лекция № 5 (2 часа).

Тема: «Нозологическая оценка лабораторного теста. Определение прогностической ценности положительного результата и прогностической ценности отрицательного результата»

1.4.1 Вопросы лекции:

1.1 Нозологическая оценка лабораторного теста.

1.2 Определение прогностической ценности положительного и отрицательного результата.

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

1. Нозологическая оценка лабораторного теста. Основной целью диагностического теста является постановка диагноза, поэтому мы должны знать вероятность того, что тест позволяет ставить правильный диагноз. Чувствительность и специфичность не дают нам подобной информации. Вместо этого необходимо анализировать результаты теста, используя прогностические значения. Нозологический уровень оценки результатов лабораторных исследований подразумевает наличие связи выявленных отклонений в анализах с определённой патологией. Степень патогномоничности лабораторных отклонений весьма вариабельна, так как формы и выраженность самого патологического процесса существенно различны, от одного случая заболевания к другому. Некоторые лабораторные тесты, тесно связанные с определённой функцией органа, ткани, организма, нарушенной патологическим процессом, носят практически избирательный характер. Обнаружение в крови повышенной активности панкреатической а-ами-лазы свидетельствует о повреждении поджелудочной железы, поскольку этот изофермент может синтезироваться только в ней. Очень высока частота выявления в крови повышенной концентрации тропонинов Т и I при инфаркте миокарда (ИМ), поскольку эти белки играют важнейшую роль в функционировании сократительной системы сердечной мышцы. Патогномоничность отклонений результатов лабораторных анализов весьма показательна, при генетически обусловленных расстройствах метаболизма (фенилкетонурия, галактоземия и др.). Вместе с тем процесс установления диагноза несовершенен: в итоге клиницист может лишь предполагать, что диагноз верен, нежели утверждать это со всей определённостью. Раньше клиницисты выражали степень уверенности в клиническом диагнозе, предваряя его формулировку словами «исключается...» или «возможно...». В настоящее время всё чаще эта уверенность в диагнозе выражается через вероятности. Поэтому врач должен понимать статистическую суть диагностической ценности лабораторных тестов в различных ситуациях. Как правило, это помогает уменьшить степень неопределенности диагноза с помощью того или иного результата лабораторного теста, в ряде случаев убедиться в его неопределенности, а иногда — лишь осознать степень своей неуверенности. Результат теста может быть либо положительным (патология), либо отрицательным (норма), а заболевание может либо быть, либо отсутствовать. Возможны четыре варианта толкования результатов теста — два истинных и два ложных. Правильный ответ — это положительный результат при наличии заболевания или отрицательный в его отсутствие. Напротив, ответ ошибочный, если результат теста положительный (ложноположительный), хотя человек здоров, или отрицательный (ложноотрицательный), хотя человек болен.

2. Определение прогностической ценности положительного и отрицательного результата.

Положительное прогностическое значение — доля пациентов с положительными результатами теста, которые были правильно диагностированы.

Отрицательное прогностическое значение - доля пациентов с отрицательными результатами теста, которые были правильно диагностированы.

Например, мы знаем, что 231 из 263 пациентов с аномальными сканами печени имели патологию, что дает вероятность правильной диагностики $231/263=0.88$. Аналогично, для 81 пациента с нормальной печенью вероятность правильной диагностики составила $54/81=0.59$. Эти вероятности имеют, однако, ограниченную достоверность. Прогностические значения по результатам теста в клинической практике сильно зависят от распространенности заболевания в исследуемой группе пациентов, которая может сильно отличаться от средней по популяции распространенности заболевания, что снижает ценность проведенного исследования. В нашей группе пациентов распространенность заболевания печени составляла 0.75. Если бы этот же тест проводился на другой группе пациентов, где распространенность заболевания составляла, скажем, 0.25, то мы получили бы положительное прогностическое значение 0.45, и отрицательное -- 0.95. Чем реже встречается заболевание, тем с большей уверенностью можно говорить, что отрицательный тест указывает на отсутствие заболевания, и с меньшей уверенностью - что положительный тест действительно указывает на наличие заболевания. В силу сказанного, прогностические значения, полученные в одном исследовании, не являются универсальными.

Положительные и отрицательные прогностические значения (PPV и NPV) для любой распространенности заболевания следует рассчитывать следующим образом:

$$\text{чувствительность} * \text{распространенность}$$

PV=

$$\frac{\text{чувствительность} * \text{распространенность} + (1 - \text{специфичность}) * (1 - \text{распространенность})}{\text{специфичность} * (1 - \text{распространенность})}$$

$$\frac{\text{специфичность} * (1 - \text{распространенность})}{\text{чувствительность} * (1 - \text{распространенность}) + \text{специфичность} * (1 - \text{распространенность})}$$

PV=

$$\frac{(1 - \text{чувствительность}) * \text{распространенность} + \text{специфичность} * (1 - \text{распространенность})}{\text{специфичность} * (1 - \text{распространенность}) + \text{чувствительность} * (1 - \text{распространенность})}$$

Если распространенность болезни очень низка, то положительное прогностическое значение не будет близко к 1, даже если и чувствительность, и специфичность высоки. Таким образом, при проведении скрининговых обследований неизбежно то, что у многих людей с положительными результатами теста эти результаты окажутся ложноположительными.

Распространенность можно интерпретировать как априорную вероятность того, что пациент болен, до проведения теста, выявляющего заболевание. Положительные и отрицательные прогнозирующие значения корректируют оценку этой вероятности для пациентов, имеющих положительные и отрицательные результаты теста. Эти оценки называют апостериорными вероятностями. Разница между априорной и апостериорной вероятностями является критерием ценности данного теста.

Для любого результата теста, мы можем сравнить вероятность получения этого результата, при условии, что пациент действительно болен, с соответствующей вероятностью, если бы он был здоров. Отношение этих вероятностей называют отношением правдоподобия, которое рассчитывается как:

$$\text{чувствительность} / (1 - \text{специфичность})$$

Отношение правдоподобия указывает на значимость теста для повышения уверенности относительно положительного диагноза. Для результатов сканирования печени, распространенность патологии была 0.75, так что шанс обнаружения болезни

априори был равен $0.75 / (1-0.75) = 3$. Чувствительность -- 0.895, специфичность -- 0.628. Шанс обнаружить наличие болезни после получения положительного результата теста -- $0.878 / (1-0.878) = 7.22$, отношение правдоподобия -- $0.895 / (1-0.628) = 2.41$. Шанс обнаружения болезни после проведения теста равен это априорный шанс, умноженный на отношение правдоподобия. Высокое отношение правдоподобия указывает на высокую ценность теста, но из этого не обязательно следует то, что положительный результат теста является хорошим критерием наличия болезни.

1. 5 Лекция № 6 (2 часа).

Тема: «Общепатологические процессы. Воспаление»

1.5.1 Вопросы лекции:

- 1.1 Воспаление Определение понятия «воспаление»
- 1.2 Динамика острого воспалительного процесса
- 1.3 Изменения обмена веществ в очаге острого воспаления

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. Воспаление. Воспаление - это сформировавшаяся в процессе эволюции защитно-приспособительная реакция организма, направленная на локализацию, уничтожение и/или удаление из организма патогенного агента и характеризующаяся явлениями альтерации, экссудации и пролиферации.

Следует обратить внимание на три составляющие части этого определения.

Во-первых, воспаление как реакция сформировалась в процессе эволюции. У низших организмов прообразом воспаления является внутриклеточное пищеварение. Когда организмы усложнились, способность к внутриклеточному пищеварению осталась лишь у отдельных клеток, а факторы, сопутствующие внутриклеточному пищеварению, стали участвовать в реакции клетки, органа, ткани на любой чужеродный агент независимо от того, будет он подвергаться внутриклеточному перевариванию или нет. В ходе эволюции процесс, когда-то обеспечивавший питание низкоорганизованных существ, превратился в реакцию организма на чужеродный агент.

Во-вторых, воспаление исполняет защитно-приспособительную роль и направлено на локализацию, уничтожение и/или удаление из организма вредоносного фактора. Однако поскольку воспаление сопровождается повреждением тканей, эта защитная реакция имеет и патологический характер. Поэтому чрезвычайно важно знать механизмы воспаления, с тем, чтобы на определенном этапе его развития поддерживать эту реакцию, а на других этапах бороться с ней, если она грозит обширным и глубоким повреждением тканей и органов.

В-третьих, для воспаления характерно сосуществование трех проявлений: альтерации (повреждение тканей), экссудации (накопление в тканях жидкости) и пролиферации (разрастание клеточных и тканевых элементов). Воспаление - это единственная реакция организма, в которой всегда присутствуют эти три компонента вместе. При опухолях, например, наблюдается альтерация и пролиферация, но нет экссудации; при аллергии мы видим альтерацию и экссудацию, но не наблюдаем пролиферации и т.д. И лишь при воспалении всегда есть в наличии все эти три компонента совместно.

В зависимости от того, какой компонент преобладает в воспалительной реакции, воспаление подразделяют на альтеративное (главное проявление - повреждение ткани), экссудативное (в воспалительном очаге имеется выраженный выпот) и пролиферативное (на первый план выступают процессы размножения клеток).

Из истории изучения воспаления. Со времен Гиппократа, Цельса и Галена мы привыкли расценивать воспаление как один из ведущих, «ключевых» патологических процессов. За последние полтора столетия патологами и клиницистами проведены тысячи

и тысячи исследований и наблюдений, написаны многие десятки монографий, руководств и учебников. Наши знания о природе и сущности воспаления во многом вышли за пределы представлений об этом процессе, постулированных Р.Вирховым и Ю.Конгеймом. Однако, даже в наши дни мы можем во многом согласиться с мнением Ю.Конгейма, изложенном в его известной книге «Общая патология», в которой он написал: «...все старания ныне установить всеобъемлющую гипотезу для объяснения сущности воспалительных изменений мне кажутся бесплодными».

В IV веке до нашей эры Гиппократ, описывая воспаление, говорил, что оно связано с перераспределением жидкостей в организме. При этом Гиппократ прозорливо предположил, что воспаление имеет обезвреживающее значение для организма и оно полезно до той поры, пока не превышает определенные пределы.

В начале нашей эры Корнелий Цельс описал четыре классических признака воспаления: rubor, tumor, calor, dolor (краснота, опухоль, жар и боль). Полтора столетиями позже Клавдий Гален добавил к ним и еще один - functio laesa - расстройство функции. В середине XVII века голландский врач Франц (Сильвиус) де ля Боэ описал экссудацию как один из кардинальных признаков воспаления. По его мнению, при воспалении кровь переходит из сосудов в ткани, и это явление сопровождается повышением температуры и изменением солевого состава межтканевой жидкости.

Подробно морфологические изменения в тканях при воспалении были описаны великим немецким патологом Рудольфом Вирховым в середине XIX века, который справедливо считал, что в центре воспалительного процесса находятся клетки, повреждение которых и является пусковым моментом воспаления.

Несколько позднее Р.Вирхова Ю.Конгейм, изучая микроциркуляцию в плавательной перепонке и в языке лягушки (классический опыт Конгейма), описал динамику сосудистых изменений в процессе воспаления и возникающие в результате этого процесса явления экссудации, краевого стояния лейкоцитов и их эмиграции за пределы сосудистого русла.

Великий русский врач и биолог И.И.Мечников, описав в конце XIX столетия явление фагоцитоза, сделал понятным для патологов такое явление как миграция лейкоцитов к очагу воспаления.

Важное значение в изучении воспаления имели работы П.Эрлиха (начало XX века), в которых он описал явления гуморального иммунитета и участие антител в воспалительном процессе. В двадцатых годах прошлого столетия немецкий биохимик и патолог Г.Шаде выдвинул физико-химическую теорию воспаления, указав на то, что при развитии воспалительного процесса резко интенсифицируются обменные процессы («пожар обмена»), в воспалительном очаге происходит накопление ионов калия, водородных ионов, осколков макромолекул, в результате чего значительно меняется осмотическое и онкотическое давление межтканевой жидкости, развивается локальный ацидоз.

Внимание многих патологов привлекало изучение проблемы регуляции воспалительного процесса. Наряду с исследованиями, посвященными нервной регуляции воспаления (исследования А.Шиллинга, А.Д.Сперанского, А.М.Чернуха и других), ряд ученых указывали на то, что процесс воспаления от его возникновения и до полного окончания регулируется многими химическими веществами, образующимися в воспалительном очаге. В частности, следует указать на работы Томаса Льюиса (1927 год) первым высказавшим предположение об участии медиаторов, например, гистамина, в регуляции воспаления. Классические работы бельгийского ученого Кристиана де Дюва (1951 год) показали какую важную роль в жизнедеятельности клетки и развитии многих патологических процессов, в том числе — и воспаления, играют мало известные до той поры клеточные органеллы - лизосомы. Открытия К. де Дюва привели к тому, что мы сейчас с полным основанием можем говорить о лизосомах как о «стартовых площадках воспаления».

Накопление знаний о природе иммунитета и механизмах развития воспалительного процесса привело к тому, что для многих исследователей к середине прошлого столетия стало очевидным: изучать эти два процесса изолированно нельзя, так как и клеточные, и гуморальные механизмы иммунитета в полной мере реализуются на протяжении всех фаз и периодов воспалительной реакции организма. Подтверждение этому мы можем найти в работах известных российских патологов И.В.Давыдовского (1928 год) и А.И.Струкова (1982 год).

Развитие электронной микроскопии, биохимических и гистохимических методов исследований, вооружение иммунологии методиками изучения межклеточных взаимоотношений привело к пониманию роли макрофагов в реализации воспалительной реакции (Б.М.Бабер, Ц.Кон, 1982, 1983 гг), а также к появлению современных представлений о роли цитокинов в воспалительном процессе (К.Брюне, 1989 год).

Даже из этой весьма краткой исторической справки ясно, что воспаление - это сложный и многокомпонентный патологический процесс, изучение которого, даже при условии применения вполне современных методов исследования, далеко не закончено. В последующем материале мы постараемся изложить основные сведения, как о патогенетических механизмах воспалительного процесса, так и описать различные формы и виды воспалительной реакции.

2. Динамика острого воспалительного процесса.

Любое внешнее (экзогенное) или внутреннее (эндогенное) воздействие на ткани организма, превышающее их адаптационные возможности, способно вызвать повреждение клеток и внеклеточных структур и, как следствие, привести к воспалению. Экзогенные повреждающие факторы могут иметь механическую, физическую, химическую или биологическую природу (микробы, вирусы, грибы, простейшие, черви, насекомые). Эндогенные повреждающие факторы образуются непосредственно в самом организме в результате определенной патологии. Например, воспалительный процесс может возникнуть в миокарде как результат некроза кардиомиоцитов после перенесенного инфаркта миокарда. В этом и других подобных случаях воспаление будет носить название «асептического воспаления».

Патогенез и стадии острого воспалительного процесса

В приведенном выше определении воспаления было указано, что воспаление характеризуется явлениями альтерации, экссудации и пролиферации. Именно эти три стадии воспаления, накладывающиеся друг на друга и сменяющие одна другую, принято считать основными этапами развития острого воспалительного процесса. Следует учесть, что пусковым моментом для начала каждой из этих трех стадий является повреждение ткани экзогенным или эндогенным повреждающим фактором. Так, например, практически сразу после альтерации ткани на периферии воспалительного очага можно наблюдать явления пролиферации, а явления экссудации начинают проявляться в самом начале вторичной альтерации. Однако каждая из стадий достигает максимума развития в различное время и именно это обстоятельство позволяет говорить об определенной сменяемости стадий воспалительного процесса.

В дальнейшем, разбирая особенности патогенеза воспаления, мы будем соотносить и привязывать отдельные звенья патогенеза к основным стадиям воспаления, а именно - к альтерации, экссудации и пролиферации. Следует указать, что этому правилу следуют и большинство патологов и клиницистов при описании воспалительного процесса. Существуют и другие принципы изложения материала по проблеме патогенеза воспаления. Так, например, А.М.Чернух выделяет в развитии воспаления пять стадий, основываясь на особенностях реакций микроциркуляторного русла в очаге воспаления. По нашему мнению этот принцип в определенной степени сужает подход к описанию патогенеза воспаления, так как, явления альтерации, экссудации и пролиферации определяются чрезвычайно большим количеством разнообразных действующих факторов, в число которых, без сомнения, входит и реакция микроциркуляторного русла.



Рис. 1. Схема патогенеза острого воспаления

Генерализованное воспаление означает, что в воспалительный процесс вовлекается весь организм, все его среды и большинство органов и систем. Однако, организм реагирует и на местный воспалительный процесс, только эта реакция не является чрезмерной, а ее последствия относительно легко устранимы, без их перерастания в тяжелую системную патологию. Так, например, периферическое (местное) воспаление "ощущается" в костном мозге с первого часа возникновения процесса и в кровь поступает находящийся "в резерве" пул гранулоцитов. Однако, несмотря на общий характер этой реакции, сам воспалительный очаг развивается локально в том или ином органе, в той или иной ткани. Более того, ткани имеют определенную типовую ячейку на территории, которой развивается воспалительная реакция. Эта ячейка - гистион, то есть функционально - структурная единица ткани, включающая в себя клетки, волокнистые образования, основную субстанцию, нервные волокна и их окончания, микроциркуляторное русло и лимфатические пути. Все эти компоненты гистиона оказываются втянутыми в воспаление и повреждаются в его динамике. Но только — элементы гистиона, или нескольких гистионов.

Все меняется, если мы встречаемся с ситуацией, при которой в силу определенных причин (о них мы поговорим позднее) патогенная флора, медиаторы и цитокины воспаления в больших количествах вырываются за пределы воспалительного очага и системно распространяются по организму. Возникает генерализованный воспалительный процесс, борясь с которым значительно сложнее, чем с острым воспалением, имеющим локальный характер. Прежде чем мы перейдем к описанию патогенеза генерализованного воспаления, нам необходимо рассмотреть те факторы, которые препятствуют распространению воспалительного процесса на организм в целом.

При локальном остром воспалении патогенные микроорганизмы, продукты распада, образующиеся в очаге воспаления, не должны распространяться за пределы этого очага, так как в противном случае воспаление может принять генерализованный характер со всеми вытекающими отсюда последствиями. Нужно обязательно указать и еще на одно обстоятельство: многие медиаторы воспаления, выполняющие в очаге воспаления важную защитную, саногенетическую функцию, выйдя за его пределы, становятся, вредоносными агентами, нанося очень серьезные, а иногда - и смертельные повреждения организму. На «барьерную» функцию местного воспаления указывали многие патологи и клиницисты. Особенно подробно они описаны в работах известного русского патолога И.В.Давыдовского, который указывал на такие барьерные факторы воспаления как замедление венозного оттока, стаз, воспалительный отек, фибринообразование и тромбообразование, формирование лейкоцитарный вала, формирование гранулем, пиогенной мембранны при абсцессах, образование капсул вокруг очага хронического воспаления и ряд других аналогичных явлений.

От каких же повреждающих агентов защищается организм барьерной функцией воспаления?

Во-первых, это сами возбудители септического воспаления - патогенные микробы. Распространение их по организму может вызвать такое тяжелейшее патологическое состояние, как сепсис.

Во-вторых, это продукты распада поврежденных клеток и тканей. Большинство из весьма токсичны. Следует иметь в виду, что продукты распада клеток и тканей образуются не только при септическом, но и при асептическом воспалении, когда речь не идет о присутствии в очаге воспаления патогенных организмов, а сами поврежденные клетки и ткани образовались в результате другого патологического процесса, например, инфаркта органа.

В-третьих, это сами медиаторы воспаления и, в их числе, цитокины.

Рассмотрим, каким же влиянием на организм, его органы и системы обладают медиаторы воспаления и провоспалительные цитокины, в том случае если они прорывают барьер острого воспалительного очага.

Патогенное воздействие на организм медиаторов воспаления и провоспалительных цитокинов

Определенные сведения о функциях цитокинов и медиаторов в очаге острого воспаления, благодаря которым осуществляется локализация и разрешение этого процесса, было уже описано выше. Однако ряд особенностей медиаторов и цитокинов, проявляющихся за пределами воспалительного очага, в случае их прорыва в системное кровообращение, позволяет говорить об их мощном патогенном воздействии на организм,

3. Изменения обмена веществ в очаге острого воспаления. Первичная и вторичная альтерация. В стадии альтерации выделяют две взаимосвязанные фазы: фаза первичной альтерации и фаза вторичной альтерации. Первичная альтерация возникает в результате непосредственного действия на ткань повреждающего фактора. При этом часть клеток разрушается самим повреждающим фактором, а часть повреждается в большей или меньшей степени за счет развившейся непосредственно после повреждения локальной гипоксией, которая обусловлена ишемией ткани (активный нейрогенный спазм, как поврежденных сосудов, так и сосудов, находящихся в непосредственной близости от участка повреждения). Гипоксический некробиоз клеток, прежде всего, сказывается на состоянии их мембран: плазматической мембранны и внутриклеточных мембран. Повреждение плазматической мембранны приводит к нарушению разделения ионов между протоплазмой клеток и внеклеточной средой. В результате в клетках происходит накопление ионов Na^+ , а вслед за ними - и воды, и ионов Ca^{++} . Повышенная гидратация клеток способна в конечном итоге вызвать их осмотический взрыв, а повышенное поступление ионов Ca^{++} в их протоплазму активирует мембранные фосфолипазы и запускает процесс образования продуцентов арахидоновой кислоты - значимых

медиаторов воспаления 1/. С другой стороны, повреждение внутриклеточных мембран может так же привести к необратимому повреждению клеток. Особенно опасно повреждение мембран лизосом и митохондрий. Гидролитические ферменты, содержащиеся в лизосомах, выходят в цитоплазму и вызывают разрушение веществ, входящих в состав 1/ Описание медиаторов воспаления и, в частности, медиаторов арахидонового каскада, смотри в разделе «3.2.1.1. Медиаторы воспаления»

цитоплазмы и клеточных органелл. Клетки лизируются («самоперевариваются») и ферменты лизосом (протеазы, липазы, гликозидазы, фосфатазы) выходят в межклеточную среду, нанося повреждение и другим близлежащим клеткам. Повреждение митохондрий резко нарушает энергообмен клеток, тормозится процесс окислительного фосфорилирования, снижается синтез АТФ. Энергетическое голодание клеток так же способно привести к их гибели. Кроме того, повреждение митохондрий нарушает утилизацию ими жирных кислот и,

при определенных условиях, стимулировать образование в митохондриях активных кислородных радикалов - активных форм кислорода (АФК), повреждающее воздействие на клетки которых хорошо известно.

Гипоксия и, следующий за нею, гипоксический некробиоз клеток повреждают не только такие клеточные органеллы как лизосомы и митохондрии. Разрушается цитоскелет клеток, гладкий и шероховатый эндоплазматический ретикулум, другие клеточные органеллы.

Подведем некоторые итоги. Первичная альтерация - это повреждение и гибель клеток в результате непосредственного воздействия на ткань любого повреждающего фактора. В результате этого процесса в межклеточную среду выходят или образуются в ней многочисленные биологически активные вещества, способные сами по себе, уже в условиях прекращения действия повреждающего фактора, продолжать разрушать клетки и другие межклеточные структуры. Иначе говоря, вслед за первичной альтерацией начинает развиваться вторая фаза альтерации - вторичная альтерация.

Большинство биологически активных веществ как разрушающих клетки и межклеточные структуры, так и участвующих в регуляции воспалительного процесса в целом, выделяются, активируются и начинают осуществлять свое действие именно во время развития вторичной альтерации. Эти биологически активные вещества получили название медиаторов воспаления. Рассмотрим основные медиаторы воспаления. Изменения обмена веществ в очаге острого воспаления

С самого начала воспалительной реакции в альтерированных тканях происходят характерные изменения обмена веществ, которые в целом могут быть охарактеризованы как "пожар обмена", то есть как резкая интенсификация всех видов метаболизма. Несколько забегая вперед, укажем, что интенсификация обменных процессов в очаге местного острого воспаления носит, в основном, саногенетический характер, в отличие от синдрома гиперметаболизма, развивающимся при генерализованном воспалении. Этот синдром является крайней степенью патологии и чрезвычайно опасен.

Однако обменные процессы в очаге воспаления меняются не только количественно, но и качественно.

Изменения углеводного, жирового и белкового обмена в очаге воспаления многоплановы и динамичны, поскольку на каждой стадии процесса между метаболическими реакциями возникают новые взаимосвязи, адекватные тем требованиям, которые в каждый конкретный момент предъявляются к клеткам и тканям. Поэтому ниже будут определены только принципиальные изменения этих видов обмена веществ, что необходимо для понимания патогенеза воспалительной реакции.

Углеводный обмен. Начиная с самых ранних стадий воспалительного процесса, в его очаге резко возрастает потребность тканей в кислороде. Несмотря на возникающую артериальную гиперемию, а в дальнейшем - из-за венозной гиперемии, тканям начинает не хватать кислорода. В то же время в воспаленных тканях очень интенсивно

используется приносимая в больших количествах с током крови глюкоза. В результате этого усиливается гликолиз, и, как следствие этого, в очаге воспаления происходит накопление больших количеств молочной кислоты.

Характерным для изменений углеводного обмена в очаге воспаления является отсутствие эффекта Пастера, заключающегося в том, что в присутствии кислорода тормозится анаэробное расщепление углеводов. Это обусловлено тем, что при анаэробном расщеплении углеводов на каждую молекулу глюкозы образуется 2 молекулы АТФ, а при аэробном - 38, то есть аэробный путь является гораздо более выгодным для клеток в энергетическом отношении. В условиях развития воспалительной реакции этот механизм нарушается и происходит интенсификация процессов анаэробного расщепления углеводов.

Жировой обмен. В крови, оттекающей от очага воспаления, повышается содержание свободных жирных кислот, так как в воспаленной ткани усиливаются процессы липолиза. Одновременно в этом регионе нарастает количество кетоновых тел, что свидетельствует не только об усилении, но и об извращении жирового обмена.

Белковый обмен. В воспаленных тканях происходит значительное усиление протеолитических процессов, в связи с чем здесь накапливается большое количество аминокислот и полипептидов. Последние в ряде случаев обладают высокой биологической активностью, инициируя ряд метаболических превращений, как в тканях, так и в экссудате.

Схема демонстрирует в обобщенно-модульном виде этапность протекания острого воспаления от момента воздействия на ткань повреждающего фактора и до завершения процессов пролиферации, репарации и регенерации. В целом, схема не требует дополнительных комментариев, так как все основные регуляционные механизмы острого воспаления подробно изложены в предшествующем материале. Необходимо, однако, напомнить, что стадии острого воспаления не просто сменяют одна другую, но накладываются друг на друга и могут достигать максимума развития почти одновременно (как это, например, происходит со стадиями вторичной альтерации и экссудации). В свою очередь стадия пролиферации начинает формироваться задолго до окончания стадии экссудации. На схеме активирующие влияния указаны сплошными стрелками, а тормозящие - стрелками пунктирными.

Исходы острого воспаления

Можно выделить три варианта исхода острого воспалительного процесса.

Во-первых, острое воспаление может завершиться уничтожением и/или удаление из организма патогенного агента, процессы пролиферации, репарации и регенерации восстановят структуры гистиона, функция органа вернется к норме. Это самый благоприятный исход воспалительного процесса.

Во-вторых, местное воспаление может перерости в воспаление генерализованное. Это происходит в тех случаях, когда воспаление разрушает барьеры, окружающие его очаг, и воспалительный процесс системно распространяется по организму.

Наконец, в-третьих, воспаление может приобрести хронический характер.

Два последние, весьма неблагоприятные для организма исхода острого воспаления, мы и рассмотрим в предлагаемом материале.

1. 6 Лекция № 7-8 (4 часа).

Тема: «Гемопоэз и его регуляция»

1.6.1 Вопросы лекции:

- 1.1. Мембранопатии эритроцитов
- 1.2. Наследственный овалоцитоз
- 1.3. Тромбоциты

1.6.2 Краткое содержание вопросов:

1. Мембранопатии эритроцитов. Эти заболевания обычно диагностируют при исследовании мазка крови на основании характерных морфологических изменений эритроцитов.

К мембранопатиям относятся три заболевания:

- наследственный микросфеноцитоз,
- наследственный овалоцитоз (включая наследственный пиропойкилоцитоз)

и наследственный стоматоцитоз .

Наследственный микросфеноцитоз

Заболевание характеризуется появлением шаровидных эритроцитов

(микросфеноцитов) и обусловлено дефектом одного из белков цитоскелета эритроцитов. В результате теряется часть мембраны эритроцита, уменьшается отношение площади поверхности к объему, и эритроцит превращается в микросфеноцит. В большинстве случаев заболевание наследуется аутосомно-доминантно. Распространенность его составляет 1 на 1000-4500.

У родственников 20% больных гематологические нарушения отсутствуют, что указывает либо на аутосомно-рецессивное наследование, либо на спонтанную мутацию (наблюдается сравнительно редко).

Наследственный микросфеноцитоз обычно диагностируют в зрелом возрасте, но иногда он проявляется вскоре после рождения.

Основные проявления - анемия, спленомегалия и желтуха.

С выраженной желтухой связано прежнее название этого заболевания - семейная гемолитическая желтуха.

Желтуха обусловлена непрямой гипербилирубинемией, бывает непостоянной и, как правило, слабее выражена в раннем детском возрасте. Из-за высокого содержания билирубина в желчи часто образуются пигментные желчные камни, даже у детей.

В костном мозге возникает компенсаторная гиперплазия эритроидного ростка с распространением красного костного мозга в диафизы длинных трубчатых костей, реже - с развитием экстрамедуллярного кроветворения. Очаги кроветворения иногда обнаруживаются на рентгенограмме грудной клетки в виде паравертебральных объемных образований. Регенераторные возможности костного мозга в 6-8 раз превышают обычную для этого заболевания скорость распада эритроцитов, поэтому анемия, как правило, бывает легкой или умеренной, а у людей, не страдающих другими заболеваниями, может и вовсе отсутствовать. Время от времени возникают апластические кризы, спровоцированные инфекцией, обычно парвовирусной.

Сplenомегалия наблюдается почти всегда. Во время системных инфекций интенсивность гемолиза может увеличиваться, что приводит к дальнейшему увеличению селезенки. Иногда возникают хронические язвы ног - такие же, как при серповидноклеточной анемии. Характерное изменение эритроцитов - микросфеноцитоз. В мазке крови микросфеноциты имеют вид мелких клеток без центрального просветления. Средний эритроцитарный объем обычно в норме или слегка снижен, а средняя концентрация гемоглобина в эритроците увеличена до 350-400 г/л. Количественным показателем сферичности эритроцитов служит их осмотическая стойкость. Поскольку у микросфеноцитов снижено отношение площади поверхности к объему, они способны вместить меньше воды и гемолизируются в гораздо менее гипотоничных растворах, чем нормальные эритроциты. Пока содержание микросфеноцитов не превышает 1-2%, результаты этого исследования остаются в пределах нормы.

Другой характерный признак наследственного микросфеноцитоза - еще большее снижение осмотической стойкости эритроцитов после инкубации крови в течение 24 ч при 37 градусах по Цельсию. Оценивают также спонтанный гемолиз - число эритроцитов, разрушившихся после инкубации крови в течение 48 ч. При наследственном

микросферацитозе он достигает 10-50%, а у здоровых людей не превышает 4%. Спонтанный гемолиз микросферацитов резко снижается, если перед инкубацией добавить в кровь глюкозу.

Генетические дефекты при наследственном микросферацитозе затрагивают белки цитоскелета эритроцитов, преимущественно те из них, которые связывают цитоскелет с мембраной. Почти у всех больных обнаружена выраженная недостаточность спектрина, лишь в части случаев обусловленная наследственными дефектами самого спектрина. Примерно у каждого второго больного выявлены мутации гена анкирина - белка, соединяющего трансмембранный белок полосы 3 со спектрином. Недостаточность анкирина наследуется аутосомно-рецессивно или аутосомно-доминантно; аутосомно-рецессивное наследование встречается реже, но анемия при нем тяжелее.

У четверти больных обнаружены мутации гена белка полосы

Недостаточность этого белка наследуется аутосомно-доминантно и приводит к легкой анемии. У большинства из оставшейся четверти больных выявлены мутации гена спектрина, нарушающие либо синтез цепей спектрина, либо самосборку его гетеродимеров. Недостаточность альфа-цепи спектрина наследуется аутосомно-доминантно и обычно протекает легко. Недостаточность бета-цепи спектрина - тяжелое заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования.

Дефекты белков цитоскелета приводят к тому, что мембрана эритроцитов утрачивает стабильность и ее участки отщепляются. Эритроцит превращается в микросферацит, не способный к деформации. Микросферациты не могут пройти через красную пульпу селезенки, в особенности протиснуться через щели в стенках ее синусов. Оказавшись в условиях гипоксии, в которых невозможно поддерживать метаболизм, микросферациты теряют еще часть мембранны. В результате в крови появляется субпопуляция совершенно круглых эритроцитов.

При диагностике, прежде всего, исключают аутоиммунную гемолитическую анемию. Для нее характерна положительная прямая проба Кумбса, в то время как анемия и спленомегалия у родственников больного указывают на наследственный микросферацитоз.

Микросферациты наблюдаются также при гемолизе, вызванном спленомегалией у больных циррозом печени, при клостиридиальных инфекциях и укусах некоторых змей (вследствие действия фосфолипаз на мембрану).

Единичные микросферациты обнаруживаются при многих гемолитических анемиях, в особенности при недостаточности Г-6-ФД.

Сplenэктомия устраняет анемию, но не морфологический дефект эритроцитов. Операционный риск низкий. Срок жизни эритроцитов после спленэктомии нормализуется полностью или почти полностью. Если же гемолиз сохраняется, значит, у больного есть добавочная селезенка или ему поставлен неверный диагноз.

Наследственный микросферацитоз может осложниться желчнокаменной болезнью, а также апластическими и гемолитическими кризами, поэтому спленэктомия показана всем больным, у которых заболевание проявляется клинически.

Нельзя проводить холецистэктомию без спленэктомии, так как результатом может стать образование камней во внутривеночных желчных протоках.

У детей до 4 лет спленэктомия не желательна в связи с высоким риском тяжелых инфекций, вызванных инкапсулированными грамположительными бактериями.

Всем больным, которым предстоит спленэктомия, проводят иммунизацию пневмококковой вакциной. С профилактической целью при гемолизе назначают фолиевую кислоту, 1 мг/сут внутрь.

2. Наследственный овалоцитоз.

Овалоциты в норме обнаруживаются у птиц, пресмыкающихся, верблюдов и лам. У человека только одно заболевание сопровождается появлением в крови значительного числа овалоцитов - это наследственный овалоцитоз. Он наследуется аутосомно-

доминанто и встречается с частотой 1 на 4000-5000 (у больных с миелодиспластическими синдромами изредка развивается приобретенный, или симптоматический, овалоцитоз). Овальными эритроциты становятся потому, что не восстанавливают свою первоначальную форму двояковогнутого диска после прохождения по микроциркуляторному руслу.

Наиболее тяжелые формы заболевания обусловлены структурной аномалией спектрина с последующим нарушением сборки цитоскелета эритроцита.

В некоторых семьях у больных обнаружена недостаточность другого белка цитоскелета - белка полосы 4.1, связывающего спектрин и актин. Еомозиготная форма - полное отсутствие этого белка - проявляется более выраженным гемолизом.

В Юго-Восточной Азии широко распространен наследственный овалоцитоз, обусловленный делецией гена белка полосы 3. Этот дефект делает мембрану эритроцита ригидной и защищает эритроциты от внедрения малярийных плазмодиев.

У подавляющего большинства больных наблюдается легкий гемолиз: концентрация гемоглобина превышает 120 г/л, содержание ретикулоцитов менее 4%, концентрация гаптоглобина снижена, срок жизни эритроцитов чуть уменьшен. При тяжелых нарушениях, имеющих место у 10-15% больных, интенсивность гемолиза значительно возрастает: срок жизни половины эритроцитов не превышает 5 сут, а содержание ретикулоцитов достигает 20%. Концентрация гемоглобина редко бывает ниже 90-100 г/л. Эритроциты разрушаются главным образом в селезенке, и при явном гемолизе она увеличена. Гемолиз устранился после спленэктомии. Независимо от наличия анемии, по меньшей мере 25% (обычно - более 75%) эритроцитов составляют овалоциты с отношением малого радиуса к большому не более 0,78. При гемолизе часто обнаруживают микроовалоциты, пойкилоциты и шизоциты. Число их увеличивается после спленэктомии. Между выраженностью гемолиза и содержанием овалоцитов соответствия нет. Осмотическая стойкость эритроцитов в норме или понижена.

Наследственный пиропойкилоцитоз имеет ту же природу, что и наследственный овалоцитоз. Оба заболевания встречаются в одних и тех же семьях, правда, наследственный пиропойкилоцитоз наблюдается редко. Для него характерны пойкилоцитоз, микроцитоз и разрушение эритроцитов при нагревании до 44-45 градусов по С (нормальные эритроциты выдерживают температуру до 49 градусов по С). Причина - недостаточность спектрина и нарушение его самосборки. Гемолиз обычно тяжелый, проявляется с детства. Спленэктомия уменьшает, но не устраниет гемолиз. Наследственный стоматоцитоз (0446)

Стоматоцитами называются эритроциты, вогнутые с одной стороны и выпуклые с другой. В окрашенном мазке крови они имеют щелевидное просветление в центре. Эта гемолитическая анемия наследуется аутосомно-доминантно. Повышена проницаемость мембраны эритроцитов для калия и натрия, вследствие чего компенсаторно усиливается активный транспорт этих катионов.

У одних больных эритроциты набухшие, с высоким содержанием ионов и воды и низкой средней концентрацией гемоглобина (гипергидратированные стоматоциты, гидроцитоз). Большинство этих случаев обусловлено отсутствием в мембране эритроцитов белка полосы 7.2 - стоматина.

У других больных эритроциты сморщеные, с низким содержанием ионов и воды и высокой средней концентрацией гемоглобина (дегидратированные стоматоциты, ксероцитоз). В окрашенных мазках крови гипергидратированные эритроциты выглядят как типичные стоматоциты, а дегидратированные имеют вид мишеней. В нативном препарате оба вида эритроцитов имеют чашеобразную форму.

Осмотическая стойкость снижена у гипергидратированных стоматоцитов и повышена у дегидратированных. Спонтанный гемолиз усилен, но устраниется при добавлении перед инкубацией глюкозы. Стоматоциты с укороченным сроком жизни встречаются у людей, у которых полностью отсутствуют антигены системы Rh (Rh null).

У большинства больных обнаруживают спленомегалию и легкую анемию. Сplenэктомия уменьшает, но не устраняет гемолиз. Показания к операции те же, что и при наследственном микросферацитозе.

3. Тромбоциты.

Тромбоциты образуются при фрагментации цитоплазмы мегакариоцитов - огромных полиплоидных костномозговых клеток, возникающих посредством эндомитоза. При этом происходит 3-5 циклов удвоения хромосом без разделения цитоплазмы. После выхода из костного мозга примерно треть тромбоцитов секвестрируется в селезенке, а оставшиеся две трети циркулируют в кровотоке 7-10 суток. В процессе гемостаза в норме потребляется лишь небольшая часть тромбоцитов; большинство же постепенно стареет и удаляется фагоцитами.

В норме уровень тромбоцитов составляет 150000-400000 1/мкл.

При уменьшении количества тромбоцитов число, размер и плоидность мегакариоцитов возрастают, что способствует повышению образования тромбоцитов. Этот процесс регулируется тромбопоэтином, рецептор которого кодируетсяprotoонкогеном MPL. Тромбопоэтин секретируется постоянно в небольших количествах и связывается с циркулирующими тромбоцитами.

Уменьшение общего количества тромбоцитов повышает уровень свободного тромбопоэтина, что стимулирует выработку тромбоцитов. Рекомбинантный тромбопоэтин испытывается в качестве средства, позволяющего предотвратить или уменьшить тромбоцитопению на фоне химиотерапии.

Уровень тромбоцитов подвержен естественным колебаниям во время менструального цикла, поднимаясь после овуляции и снижаясь после начала менструации. Он зависит также от питания больного, понижаясь при тяжелом дефиците железа, дефиците фолиевой кислоты и дефиците витамина B12.

Тромбоциты входят в число показателей острой фазы воспаления; при сепсисе, опухолях, кровотечениях, легком дефиците железа может возникать вторичный тромбоцитоз. Предполагается, что выработка тромбоцитов при этом неопасном состоянии стимулируется ИЛ-3, ИЛ-6 и ИЛ-11. Напротив, тромбоцитоз при хронических миелопролиферативных заболеваниях (эритремия, хронический миелолейкоз, сублейкемический миелоз, тромбоцитемия) может приводить к тяжелым кровотечениям или тромбозам. Бесконтрольная выработка тромбоцитов у этих больных связана с клональной патологией стволовой кроветворной клетки, затрагивающей все клетки-предшественники.

Тромбоциты (кровяные пластинки) при активации в процессе свертывания крови или под действием комплекса антиген - антитело выделяют, как базофилы и тучные клетки, медиаторы воспаления.

В случае повреждения эндотелия они прилипают к субэпителиальной поверхности поврежденной сосудистой стенки, образуя агрегаты. При этом из тромбоцитарных гранул высвобождается их содержимое, в том числе серотонин и фибриноген, что приводит к повышению проницаемости капилляров, активации комплемента и, вследствие этого, к привлечению лейкоцитов.

Тромбоциты (The blood platelets, кровяные пластинки) - самые мелкие клетки крови, представляют собой диски, лишенные ядер. Их диаметр колеблется в пределах 1,5-4 мкм, толщина - 0,5-2 мкм, объем - 7-8 кубических мкм. Содержание кровяных пластинок - тромбоцитов в крови здорового человека составляет 150 - 300 тысяч в 1 мкл. Тромбоциты - один из главных участников гемостаза. Тромбоциты экспрессируют белки МНС класса I, рецепторы для IgG (Бс-гамма1Ш, CD32) и низкоаффинные рецепторы для IgE (Бс-эпсилонИП CD23). Кроме того, мегакариоциты и тромбоциты несут рецепторы для фактора VIII свертывания крови и другие функционально важные молекулы, такие как CD41 и CD42. Первый из них - это цитоадгезин, ответственный за связывание с фибриногеном, фибронектином и витронектином. Оба эти комплекса представляют собой

еще и рецептор для фактора Виллебранда. Имеется также дополнительный рецептор к витронектину - CD51.

По данным трансмиссионной электронной микроскопии тромбоциты имеют трехслойную плазматическую мембрану, подобную мембранам других клеток. В их цитоплазме различают гиаломер (гиалоплазму) и грануломер. Гиаломер представляет собой гомогенную или тонкогранулярную субстанцию, плотность которой варьируется в зависимости от функционального состояния тромбоцитов и их возраста. В гиаломере расположены микротрубочки и микрофиламенты (микроволокна), представляющие собой две морфологические формы тромбастенина - сократительного белка тромбоцитов (тромбоцитного актомиозина).

Под грануломером понимают совокупность гранул, расположенных в цитоплазме тромбоцитов. Среди них различают плотные гранулы (электроннодense), альфа-гранулы, системы открытых и закрытых канальцев, митохондрии, зерна гликогена и другие. В плотных гранулах накапливаются и хранятся АДФ (недетаболический пул), серотонин, и ионы кальция. В альфа-гранулах содержится фактор 4 тромбоцитов, бетатромбоглобулин, тромбоспондин, фибронектин, тромбоцитный фибриноген, тромбоцитный фактор Виллебранда, факторы роста и другие белки.

В тромбоцитах есть также лизосомы, в которых хранятся гидролитические ферменты (гидролазы).

Тромбоциты образуются в костном мозге путем отщепления участков цитоплазмы от мегакариоцитов. Они циркулируют в крови 5 - 11 дней, потом разрушаются в печени, легких и селезенке. Тромбоциты содержат большое количество серотонина и гистамина, ферменты гликолиза, пентозофосфатного цикла, цикла лимонной кислоты и дыхательной цепи. В них имеется АТФ-аза и большие запасы АТФ.

1.7 Лекция № 9 (2 часа).

Тема: «Общеклинический анализ крови. Лейкограмма»

1.7.1 Вопросы лекции:

- 1.1. Гранулоциты: введение.
- 1.2. Нейтрофилы: патология, общие сведения.
- 1.3. Нейтропении.

1.7.2 Краткое содержание вопросов:

1. Гранулоциты: введение.

Гранулоциты - белые кровяные тельца, в цитоплазме которых при обычных методах фиксации и окрашивания выявляются гранулы.

Все типы гранулоцитов образуются в костном мозге, поэтому их называют клетками миелоидного ряда.

Диаметр гранулоцитов в сухом мазке колеблется от 10 до 17 мкм. Гранулоциты составляют около 60% всех лейкоцитов крови. Время пребывания гранулоцитов в кровеносном русле может быть очень мало, максимальное время равно примерно двум суткам.

В зависимости от свойств гранул гранулоциты подразделяются на нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы), эозинофильные гранулоциты и базофильные гранулоциты. Нейтрофилы (полиморфно-ядерные лейкоциты, ПЯЛ, ПМЛ, РМН). 93 - 96% всех лейкоцитов составляют нейтрофилы, содержание которых в крови составляет примерно 4150 в 1 мкл. Они называются также полиморфноядерными лейкоцитами. Полиморфноядерные нейтрофилы - неделяющиеся клетки с многодольчатым (сегментированным) ядром и набором гранул, которые не прокрашиваются такими красителями, как гематоксилин и эозин. Они высвобождаются костным мозгом со скоростью примерно 7млн/мин. По сравнению с моноцитами и макрофагами, которые

могут сохраняться месяцы или даже годы, нейтрофилы - короткоживущие (2-3 суток) клетки. Дисфункции нейтрофилов, такие как различные формы нейтропении, дефицит адгезии нейтрофилов или хронический грануломатоз, приводят к тяжелым формам подверженности больных бактериальным инфекциям, что подчеркивает ключевую роль нейтрофилов в обеспечении врожденной формы иммунитета. С другой стороны, гиперактивация нейтрофилов также приводит к патологиям. Такие аномалии, как повреждение при реперфузии, васкулит, синдром дыхательной недостаточности взрослых, или гломерулонефрит, свидетельствуют о важном медицинском значении гиперактивации нейтрофилов. В борьбе с бактериями нейтрофилы пользуются богатым набором методов, таких как фагоцитоз, образование кислородных радикалов и секреция различных ферментов деградации. Нейтрофилы обеспечивают основную защиту от пиогенных (гноеродных) бактерий и могут существовать в анаэробных условиях. Они остаются главным образом в крови, за исключением случаев их локализации в очагах острого воспаления. Нехватка нейтрофилов приводит к хроническим инфекциям.

2. Нейтрофилы: патология, общие сведения.

Основная функция этих клеток - фагоцитоз. Действие нейтрофилов, как и макрофагов, неспецифично. Время их нахождения в кровеносном русле в среднем составляет 6 - 8 ч, так как они быстро мигрируют в слизистые оболочки. При острых инфекционных заболеваниях число нейтрофилов быстро нарастает. Они способны получать энергию путем анаэробного гликолиза и поэтому могут существовать даже в тканях, бедных кислородом: воспаленных тканях, отечных тканях или плохо кровоснабжаемых тканях. Нейтрофилы фагоцитируют бактерии и продукты распада тканей и разрушают их своими лизосомными ферментами (протеазами, пептидазами, оксидазами, дезоксирибонуклеазами и липазами). Гной состоит главным образом из нейтрофилов и их остатков. Лизосомные ферменты, высвобождающиеся при распаде нейтрофилов, вызывают размягчение окружающих тканей, т.е. формирование гнойного очага (абсцесса). По нейтрофилам можно определить пол человека: у женщин 7 нейтрофилов из 500 содержат особые образования - "барабанные палочки нейтрофилов". Нейтрофилы захватывают, убивают и переваривают микроорганизмы, в особенности бактерии, т.е. являются главными "профессиональными фагоцитами" наряду с макрофагами, но значительно уступают им по размерам и времени жизни. Нейтрофилы имеют общего предшественника вместе с другими форменными элементами крови и доминируют среди остальных лейкоцитов. Основными токсинами нейтрофилов является пероксид и его радикалы; некоторые гранулы содержат также бактерицидные белки, например, лактоферрин. Нейтрофилы обеспечивают основную защиту от пиогенных (гноеродных) бактерий и могут существовать в анаэробных условиях. Они остаются главным образом в крови, за исключением случаев их локализации в очагах острого воспаления. Нехватка нейтрофилов приводит к хроническим инфекциям. Полиморфноядерный нейтрофил - неделяющаяся короткоживущая клетка с сегментированным ядром и набором гранул, которые не прокрашиваются такими красителями, как гематоксилин и эозин.

Неактивные циркулирующие нейтрофилы являются шарообразными клетками диаметром около 7 мкм. При стимуляции они резко меняют свою форму в результате образования асимметричных выростов, называемых псевдоподиями и необходимых для миграции. Для входа в воспаленную ткань, нейтрофилы покидают кровоток преимущественно в посткапиллярных венулах. Пересечение нейтрофилом эндотелия кровеносного сосуда происходит в несколько этапов. Нейтрофил касается стенки эндотелия и катится по ней некоторое время, затем плотно присоединяется к эндотелию и, наконец, проникает сквозь него (это явление называется диапедез). При диапедезе нейтрофил протискивается между эндотелиальными клетками сквозь щель в несколько раз уже его собственного диаметра, демонстрируя замечательную гибкость своих мембран и цитоскелета. Актиновый цитоскелет абсолютно необходим для амебоидного движения

клеток, которое является основным способом клеточного движения у многоклеточных организмов. Передний край мигрирующей клетки обогащен свежеполимеризованными филаментами актина. Более того, образование псевдоподий в точности совпадает по времени с увеличением количества полимеризованного актина. С другой стороны, ингибирование полимеризации актина делает хемотаксис невозможным. Эти и другие данные явились основой широко распространенной теории, согласно которой полимеризация актина является движущей силой продвижения переднего края мигрирующей клетки.

Предшественники нейтрофилов на последних стадиях созревания уже не делятся и, пройдя стадию метамиелоцита, превращаются в палочкоядерный нейтрофил с колбасовидным ядро. По мере созревания палочкоядерного нейтрофила его ядро сегментируется. В норме ядро нейтрофила содержит до четырех сегментов. Нейтрофилы: патология, общие сведения.

Дефект на любом из этапов жизни нейтрофилов может привести к нарушению их функции и ослаблению защитных сил организма. Воспалительная реакция при этом, как правило, снижена, что клинически проявляется тяжелыми рецидивирующими бактериальными и тяжелыми рецидивирующими грибковыми инфекциями, плохо поддающимися лечению. Нарушение функции нейтрофилов диагностируют по клиническим признакам, к наиболее характерным из которых относятся афты (сероватобелые негноящиеся язвы слизистых), гингивит и пародонтит.

При наследственных дефектах нейтрофилов инфекция может развиться уже в первые дни жизни. Обычно поражаются кожа, верхние дыхательные пути, легкие, а также кости. Сепсис и менингит наблюдаются редко. Правда, при некоторых заболеваниях риск инфекций непостоянен, и у больного на протяжении нескольких месяцев и даже лет может не быть ни одной тяжелой инфекции.

Раньше при наследственных дефектах нейтрофилов продолжительность жизни не превышала 30 лет. Сегодня благодаря активному лечению эти больные живут дольше.

3. Нейтропения. Нейтропения (уменьшение числа нейтрофилов в крови). Уменьшение числа нейтрофилов (менее 500 функционально полноценных нейтрофилов в 1 мкл) в крови называется нейтропенией. Последствия нейтропении - наглядный пример того, насколько важна роль нейтрофилов в защите организма от инфекции. Многочисленные клинические наблюдения показывают, что предрасположенность к инфекциям резко возрастает, когда число нейтрофилов падает ниже 1000 1/мкл. Когда число нейтрофилов (палочкоядерных и сегментоядерных) менее 500 1/мкл, нарушаются взаимоотношения организма с нормальной микрофлорой (кишечника, полости рта). Если число нейтрофилов не превышает 200 1/мкл, не развивается воспаление.

Нейтропения бывает обусловлена уменьшением образования нейтрофилов, их перераспределением или усиленным разрушением. Если налицо глубокая нейтропения или снижение числа нейтрофилов в динамике, не реагирующие на инфекцию и иные факторы, стимулирующие выход нейтрофилов из костного мозга, показано обследование. При острой нейтропении, например возникшей на фоне химиотерапии, риск инфекций выше, чем при нейтропении, существующей месяцами или годами и исчезающей при инфекции или в пробе с эндотоксином.

Чаще всего встречается нейтропения, вызванная, цитостатиками и иммунодепрессантами, - эти средства сейчас широко применяют для лечения злокачественных опухолей и аутоиммунных заболеваний. Они вызывают нейтропению за счет подавления пролиферации стволовых клеток в костном мозге.

Некоторые antimикробные средства - хлорамфеникол, триметоприм / сульфаметоксазол, фторцитозин, видарабин, антиретровирусный препарат зидовудин - могут вызвать нейтропению за счет подавления миелоидного ростка кроветворения. Степень угнетения кроветворения зависит от продолжительности лечения и, как правило, от дозы препарата.

Для лечения этой формы нейтропении, и прежде всего - нейтропении у получающих химиотерапию онкологических больных, применяют рекомбинантные препараты Г-КСФ (например, филграстим).

Другая важная причина нейтропении - препараты, которые, выступая в роли гаптенов, опосредуют разрушение нейтрофилов или их предшественников иммунной системой. В этом случае нейтропения развивается примерно на 7-е сутки после начала приема препарата. Если препарат назначен не впервые, то антитела к нему уже есть, и нейтропения может развиться через несколько часов после приема. Эту форму лекарственной нейтропении может вызвать практически любой препарат, но главной причиной служат широко используемые антимикробные средства: сульфаниламиды, пенициллины и цефалоспорины.

Иногда нейтропения сопровождается лихорадкой и эозинофилией. Число нейтрофилов может снизиться значительно, но быстро нормализуется после отмены препарата. Как правило, уже через 5-7 суток число нейтрофилов увеличивается, а к 10-м суткам нормализуется полностью.

Повторное назначение препарата, вызвавшего нейтропению, недопустимо из-за высокого риска острой и глубокой нейтропении. По той же причине следует избегать провокационных проб. Еще одна форма приобретенной нейтропении - аутоиммунная нейтропения. Она обусловлена антителами к нейтрофилам. Нейтропению может вызвать также вирусная инфекция, в том числе ВИЧ.

Иногда приобретенная нейтропения проявляется периодическим снижением числа нейтрофилов, с интервалом в несколько недель. Не исключено, что периодическая приобретенная нейтропения обусловлена увеличением числа NK-лимфоцитов. Улучшения можно добиться назначением глюкокортикоидов.

Описан синдром, при котором нейтропенией сопровождается клональная пролиферация больших гранулярных лимфоцитов. Помимо нейтропении возможны умеренный лимфоцитоз в крови и костном мозге, поликлональная гипергаммаглобулинемия и спленомегалия в отсутствие увеличения лимфоузлов. Заболевание может протекать хронически и относительно стабильно, проявляясь рецидивирующими бактериальными инфекциями. Однако существует и злокачественная форма болезни. Тот факт, что спустя 11 лет описано самопроизвольное выздоровление, свидетельствует о роли иммунорегуляторных нарушений в патогенезе по крайней мере одной из форм заболевания.

Наследственные нейтропении встречаются редко и могут проявиться уже в раннем детском возрасте стойкой глубокой нейтропенией или агранулоцитозом. К врожденным нейтропениям относятся синдром Костмана (менее 100 нейтрофилов в 1 мкл; крайне неблагоприятный прогноз); хроническая гипопластическая нейтропения (от 300 до 1500 нейтрофилов в 1 мкл); метафизарная хондродисплазия, тип Мак-Кьюсики; синдром Швахмана (нейтропения в сочетании с недостаточностью экзокринной функции поджелудочной железы); другая наследственная патология иммунной системы (Х-сцепленная агаммаглобулинемия, атаксия - телеангидрактазия, дефицит IgA). Описана тяжелая врожденная нейтропения, обусловленная мутацией гена, который кодирует рецептор Г-КСФ (ген расположен на 1-й хромосоме). В результате мутации резко снижается чувствительность к Г-КСФ и возникает предрасположенность к гемобластозам. Периодическая наследственная нейтропения наследуется аutosомно-доминантно и характеризуется появлением нейтропении с четкими интервалами в 3 нед. В основе заболевания лежит периодическое кроветворение. Клинические проявления могут возникнуть уже в грудном возрасте. Патогенез неизвестен, но в ряде случаев кроветворение нормализуется на фоне лечения глюкокортикоидами и филграстимом. Нейтропения у новорожденного может быть обусловлена трансплacentарным переносом IgG-антител, разрушающих нейтрофилы плода, или лекарственными средствами, принятыми беременной (например, тиазидными диуретиками). Антитела к нейтрофилам

характерны для синдрома Фелти (ревматоидный артрит, спленомегалия и нейтропения). В тех случаях, когда после спленэктомии число нейтрофилов увеличивается, отмечается и снижение титра IgG-антител к нейтрофилам. Следовательно, лечебный эффект спленэктомии при синдроме Фелти заключается в снижении уровня аутоантител. Спленомегалия с задержкой и усиленным разрушением нейтрофилов в селезенке наблюдается также при лизосомный болезнях накопления и портальной гипертензии. При инфекции и других видах острого воспаления, когда одновременно ускоряется выход нейтрофилов из костного мозга и происходит их перераспределение, лейкоцитоз достигает величины 10000-25000 1/мкл. Стойкий лейкоцитоз до 30000-50000 1/мкл и более обозначают термином лейкемоидная реакция. В отличие от лейкоза, при лейкемоидной реакции в крови циркулируют нормальные, преимущественно зрелые нейтрофилы.

1.8. Лекция № 10 (2 часа).

Тема: «Оценка результатов определения биохимических показателей крови при основных формах патологии и их интерпретация»

1.8.1 Вопросы лекции:

1. 1. Биохимический анализ, его значение.
- 1.2. Интерпретация биохимических показателей.

1.8.2 Краткое содержание вопросов:

1. Биохимический анализ, его значение.

Проведение анализа заключается в процессе взятия крови из локтевой вены, в разтере примерно 5 мл (зависит от сложности анализа и заболевания, а также от состояния организма и возраста). В лаборатории, анализ помещают в центрифугу, которая вращаясь с определенной скоростью отделяет кровь от плазмы, последнюю из которых потом исследуют. Дальнейшее исследование проводится с помощью всевозможных реактивов, которые применяются в зависимости от того, какие именно частицы необходимо исследовать. Все полученные данные записывают на бланк, расшифровкой которого и занимается лечащий врач. Важно знать, что показатели анализа могут сильно отличаться ввиду разницы в возрасте, поле, наличии неизвестной беременности и т. д. Очень часто пациенты принимаются самостоятельно сдавать анализ, находят некие несоответствия в интернете и занимаются самолечением, чего делать категорически нельзя. Показатели анализа могут отличаться у каждого организма, но при этом в комплексе с другими показателями иметь нормальный уровень. Кроме этого все показатели между собой связаны, и отклонение одного с последующим отклонением другого может быть специфической нормой для организма, а не заболеванием. Показания к проведению анализа Кровь, как известно, является самой важной субстанцией в организме человека, соответственно именно она является показателем многих заболеваний и их причин, патологий и особенностей каждого человека. Биохимический анализ крови человека не всегда проводится при угрозе здоровью и жизни. Иногда его назначают в целях изучить состав крови определенного человека, чтобы на его основе рассчитать необходимые параметры диагностики. Исследование плазмы крови с помощью биохимических реагентов проводится в следующих случаях: Наличие жалоб на состояние здоровья, описание которых не смогли составить четкой картины для терапевта, либо выраженных симптомов вовсе не существует. При нарушении пищеварения, диареи, продолжительной тошноте, головокружении, потерях сознания и т. д. Больным, после назначения курса лечения для контроля его эффективности. Исследование крови на наличие биохимических маркеров

наследственных патологий и заболеваний. Для установки точного диагноза при заболевании внутренних органов как предпосылки. При подозрении на сахарный диабет, токсическое отравление, авитаминоз, желтуху и другие аутоиммунные заболевания. Когда симптомы указывают на возможные проблемы функционирования сердечной системы, а также наличие ее хронических и наследственных патологий. При беременности развернутый биохимический анализ крови сдают регулярно в соответствии с графиком развития плода. Женщинам с отрицательным резус-фактором крови плазму крови необходимо исследовать каждые 2 недели, для своевременного выявления развития антител к плоду. В качестве профилактики, для выявления скрытых бессимптомных заболеваний и патологий. Необходимо сдавать не реже чем 2 раза в год. Несмотря на то, что сдача анализа крови без направления будет не бесплатной, стоит все-таки уделить время и деньги своему организму. Иногда случайная сдача крови выявляет необратимые процессы, которые на ранних стадиях еще можно замедлить или остановить. Подготовка к сдаче анализа Сдавать кровь на биохимический анализ необходимо по определенным правилам, придерживание которых посредством влияет на результаты самого анализа: Биохимическое исследование плазмы крови назначается, как правило, утром с 8 до 11 часов натощак. Необходимо, чтобы до сдачи крови человек не принимал пищу в течение 8-10 часов, но не более 14 часов. До сдачи анализа в день его забора можно употреблять только воду, никаких чаев, тем более с сахаром. Если для лечения присутствующего заболевания вы проводите регулярную медикаментозную терапию, либо самостоятельно принимаете какие-то препараты проконсультируйтесь с врачом, как они могут повлиять на анализ, и стоит ли прекратить их прием. Сюда стоит включить и прием контрацептивных и обезболивающих препаратов. Для сдачи анализа крови необходимо за сутки прекратить употреблять алкогольные напитки. Если есть привычка курить сигареты, необходимо ее прекратить за 1 час до сдачи анализа. Если вы увлекаетесь спортом или переносите тяжелые физические нагрузки на работе, перед забором крови необходимо отдохнуть. Физические тренировки перед сдачей анализ, а также стрессы и переживания могут плохо отразиться на результатах. Перед тем как зайти в манипуляционную необходимо отдохнуть 20 мин в комнате ожидания, чтобы успокоить кровоток и ферменты в организме. Если в этот же день вам назначены другие физиотерапевтические или манипуляционные процедуры, кровь необходимо сдать в первую очередь, так как другие анализы могут повлиять на качественный состав крови. Чем точнее будут выполнены все предписания, тем правильнее получится анализ, и точнее можно будет установить заболевание или его отсутствие. Неправильные показатели требуют повторной сдачи крови, соответственно повторных трат времени и денег. Узнайте про анализ ГГТП — что это такое и когда его сдавать, прочитав нашу аналогичную статью. Что показывает анализ? В результатах биохимического анализа плазмы крови отображается количественное содержание всех составляющих ее элементов. В зависимости от направленности анализа в бланк отчета могут вписываться или не вписываться некоторые показатели. Обусловлено это тем, что некоторые элементы исследуются только в случае предпосылок к сложным заболеваниям и оплачиваются дополнительно. При получении анализа можно увидеть недостаток или излишек определенного элемента по сравнению с нормативным показателем. Нормы показателей Существуют определенные нормы показателей биохимического анализа плазмы крови, принятые Всемирной организацией здравоохранения как приемлемые для существования. Конечно, у каждого человека показатели биохимии могут отличаться, однако существенное их отклонение от принятых параметров может быть знаком развития патологии. Для мужчин Нормы значений элементом составляющих основу плазмы крови у мужчин немного отличаются от женских. Некоторые элементы, кроме фолиевой кислоты в мужской крови содержаться в объеме на 10% больше чем в женской. Обусловлено это тем, что мужской организм переносит больше физических нагрузок, соответственно и больше расходует этих элементов. Для женщин

Количественные данные биохимического анализа крови у женщин зависят непосредственно от общего состояния организма. Кровь может изменять свой состав во время менструального цикла, беременности, после родового периода, после выкидышей и абортов, во время климакса. Поэтому исследуя женскую кровь необходимо учитывать все эти факторы. Основные показатели, их характеристика Нормы основных показателей анализа представлены в таблице: Показатель Норма Общий белок 64-83 г/л Альбумин 35-50 г/л Миоглобин 12-76 мкг/л С-реактивный белок 0,5 г/л Трансферрин 2-4 г/л Триглицерид 0,41-1,8 ммоль/л Общий холестерин 5,2 ммоль/л Витамин В12 208-963 пг/мл Железо 9-30 мкмоль/л Калий 3,5-5 ммоль/л Кальций 2,25-2,5 ммоль/л Магний 0,75-1,25 ммоль/л Натрий 136-145 ммоль/л Фосфор 0,87-1,45 ммоль/л Фолиевая кислота 10-12 мкмоль/л Хлор 98-107 ммоль/л Билирубин 3,4-17,1 мкмоль/л Глюкоза 3,3-5,5 ммоль/л Фруктозатин 0-285 мкмоль/л В аналогичной статье вы найдете таблицу норм билирубина по возрасту у мужчин. Для того чтобы немного разобраться что же написано на маленькой бумаге, которую из лаборатории приносят вашему лечащему врачу необходимо знать, что дает расшифровка биохимических показателей крови и их значения при нормальном развитии организма: Общий белок, как основа всей белковой части крови, помогает определить нарушение обмена веществ и питательности пищи, а также развитие злокачественных новообразований в организме. Повышенный белок является признаком развития опухолей и ревматических заболеваний, пониженный – проблема в работе пищеварительных органов. У взрослого человека норма белка составляет 64-83 единицы. Альбумин отвечает за содержание белка в крови (до 65%). Повышенный уровень свидетельствует о протекании инфекционного заболевания, пониженный предупреждает о необходимости стены режима питания. У взрослых нормальным показателем является 35-50 г/л. Гликированный гемоглобин является составляющей частью гемоглобина, превышение уровня которой будет свидетельствовать о развитии предпосылок к диабету степени, а также об эффективности его лечения. Нормальным уровнем является 5,7% от общего гемоглобина. Все что выше требует дополнительного исследования на предмет развития сахарного диабета. Миоглобин – белок, отвечающий за перенос железа кровью. Если показатель повышенный, то скорее всего имеются серьезные отклонения в работе сердца. Уровень данного белка имеет широкие границы, выход за которые является серьезной причиной для беспокойства. У мужчин 19-92 мкг/л, у женщин 12-76 мкг/л. С-реактивный белок отвечает за воспаления развивающиеся внутри организма любой сложности. Необходимое количество белка для нормального функционирования – 0,5 г/л. Любое превышение данного уровня свидетельствует о воспаление какого-то органа. Трансферрин отвечает за трансфер железа и назначается при симптомах указывающих на анемию, цирроза печени или избытка железа в организме. Показатель для здорового организма 2-4 г/л. Триглицерид отображает нарушения в работе сердца. При повышенном значении возникают подозрения на нарушение работы сердца или сахарный диабет. Недостаток триглицерида указывает на то, что следует обратить внимание на полноценность питания и возможные отклонения в работе щитовидной железы. Общий холестерин в идеале составляет 5,2 ммоль/л. Если уровень превышает норму это является предпосылкой для образования сахарного диабета и атеросклероза. Пониженный уровень химического элемента может быть признаком психологических расстройств. Витамин В12 должен содержаться в крови в объеме 208-963 пг/мл. Если показатель повышен, возможно развитие лейкемии, нарушение работы почек и печеночной недостаточности. Дефицит витамина В12 указывает на нарушение в работе ЖКТ. Кроме того нехватка витамина наблюдается у людей увлекающихся вегетарианским питанием. Железо в талом количестве показывает нарушение метаболических процессов в организме. Количество элемента в плазме крови должно находиться в рамках 9-30 мкмоль/л. Калий отвечает за работу сердечно-сосудистой системы. Его нехватка является прямым показателем нарушения процесса обмена веществ, развитии гипокалиемии. Норма 3,5-5 ммоль/л. Кальций является

структурным элементом костных и мышечных тканей. Снижение уровня кальция в плазме крови может быть обусловлено патологиями в развитии печени и почек. У взрослых показатель уровня кальция находится в пределах 2,25-2,5 ммоль/л. Магний является основой формирования нервных импульсов и сигналов. Норма 0,75-1,25 ммоль/л у взрослых. Натрий является неотъемлемым элементом триады магний-калий-натрий. Все эти вещества взаимосвязаны. 136-145 ммоль/л – нормативное содержание микроэлемента в крови. Избыток натрия в крови показывает нарушение функционирования точевыводящей системы, понижение уровня о формировании предпосылок к сахарному диабету и проблемах в работе печени. Фосфор является структурно необходимым элементом для работы нервных окончаний в мышечных тканях. 0,87-1,45 ммоль/л – значения для взрослого здорового организма. Фолиевая кислота необходима для оплодотворения и вынашивания ребенка, принимает участие в процессе кроветворения, обмена аминокислот и расщепления сахара. Дефицит элемента может наблюдаться при алкоголизме, беременности и долгосрочном курсе антибиотиков. Уровень у взрослых 10-12 мкмоль/л. Хлор является регулятором кислотно-щелочного баланса крови. Уровень хлора превышающий норму является прямым показателем недостатка воды в организме. Дефицит хлора является показателем гормональных нарушений и черепно-мозговых травм. Норма 98-107 ммоль/л. Низкомолекулярные азотистые вещества являются продуктами белкового обмена и выводятся почками. Креатин, точевая кислота, точевина в избытке свидетельствуют о нарушении работы почек, в недостатке о неправильном и недостаточном питании. Нормативные значения у женщин: 53-97 мкмоль/л, 150-350 мкмоль/л, 2,2-6,7 ммоль/л – соответственно. У мужчин: 62-115 мкмоль/л, 210-420 мкмоль/л, 3,8-7,3 ммоль/л. Пигменты или билирубин повышается во время нарушения функционирование желчевыводящих протоков и печени (желтуха). Уровень у взрослых – 3,4-17,1 мкмоль/л. Углеводы: глюкоза (3,3-5,5 ммоль/л) и фруктозатин (0-285 мкмоль/л) являются показателями сахара в крови. Первый отвечает за энергетическое снабжение организма, второй в соединение с первым за уровень сахара в течение 2-3 недель. Повышенное содержание углеводов в крови является предпосылкой для развития сахарного диабета. Ферменты или печеночные показатели: Аланинатинотрансфераза участвует в аминокислотном обмене, норма для женщин – до 31 ед/л, для мужчин – до 41 ед/л. В избытке фермент свидетельствует о патологиях печени. Амилаза – 28-100 ед/л. Отвечает за расщепление углеводов, продуцируется слюнными железами. Отклонение от уровня является показателем нарушения работы ЖКТ. Панкреатическая амилаза – 0-50 ед/л, отклоняется от нормы при нарушении работы поджелудочной железы. Аспартататинотрансфераза – мужчины до 40 ед/л, женщины до 32 ед/л. Превышает норму в случае серьезного внешнего или внутреннего повреждения печени. Гамма-глутамилтрансфераза – женщины 6-42 ед/л, мужчины 10-71 ед/л. Превышается уровень в случае, если человек страдает алкоголизмом и его последствиями. Креатинкиназа содержится в минимальном количестве, повышенные показатели которого даже в небольшой степени являются реакцией организма на заболевания сердца и соединительной ткани. Значение у взрослых 0-25 ед/л. Лактат (молочная кислота) отвечает за насыщность тканей кислородом. Если кислорода в крови недостаточно уровень фермента повышается. Норма – 0,5-2,2 ммоль/л. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Для детей и взрослых старше 12 лет норма ЛДГ – 250 ед/л. Повышенный показатель фермента может наблюдаться у новорожденных и беременных женщин. Липаза расщепляет избыточные жиры в организме. Уровень должен находиться в пределах 0-190 ед/л. Фосфатаза щелочная является прямым показателем фосфорного обмена в организме. Чрезмерное содержание фермента в крови будет результатом нарушения функционирования печени и почек. Норма содержания для женщин 0-240 ед/л, для мужчин – 0-270 ед/л. Причины отклонений от нормы Основными причинами изменения биохимических показателей крови от нормы являются наличие заболеваний, о

которых и свидетельствуют соответствующие значения. Стоит учитывать что иногда значения могут не совпадать с нормативными, но как правило это будет последствием неправильного питания или образа жизни. Употребление алкоголя, табакокурение, прием жирной и жареной пищи, чрезмерное потребление сладкого и тучного, газированных напитков и продуктов фастфуда могут отражаться на биохимическом анализе крови. Развитие заболевания может еще не начаться, но по анализу будет видно, чем чреват ваш нынешний образ жизни.

1. Интерпретация биохимических показателей. Биохимический анализ крови выявляет ферментативные изменения, происходящие в организме. Как правило эти изменения происходят из-за воспалительных процессов, приводящих к нарушениям окислительно-восстановительных реакций, увеличению проницаемости клеточных мембран и, как следствию, выхода ферментов за пределы клеток. К сожалению биохимический анализ не выявляет специфические маркеры поражений определенных тканей, а отражает функциональное состояние органов и систем организма. При этом одновременно определяется количество нескольких ферментов для дальнейшего сопоставления их взаимосвязанного изменения. В приводимой ниже таблице представлены основные биохимические показатели крови, оцениваемые в ветеринарной лабораторной диагностике и отражаемые ими патологии.

Показатель	Место нахождения	Повышение	Понижение
Общий белок	Сыворотка крови: альбумины, глобулины, фибриноген (при анализе учитывать гематокрит)	<u>При уменьшении жидкости:</u> тяжелые ожоги; генерализованный перитонит; непроходимость кишечника; неукротимая рвота; профузный понос; несахарный диабет; хронический нефрит; усиленное потоотделение; диабетический кетоацидоз. <u>Синтез патологических белков</u> при: хроническом полиартрите; активном хроническом гепатите; острых и хронических инфекциях; аутоиммунных заболеваниях; циррозе печени без выраженной печеночно-клеточной недостаточности. Лекарства: кортикоステроиды	<u>При увеличении жидкости:</u> водной нагрузке олиго- и анурии; введение больших количеств раствора глюкозы; больным сердечной декомпенсации; повышенной секреции антидиуретического гормона <u>При уменьшении белка</u> недостаточном поступлении белка; нарушение функции ЖКТ; подавлении биосинтеза белка, при хронических гепатитах, циррозах, врожденных нарушениях синтеза отдельных белков крови; повышенном распаде белка (злокачественные новообразования, обширные ожоги, гиперфункция щитовидной железы (тиреотоксикоз),

			состояния после операции, длительная лихорадка, травмы, повышенной потере белка (нефротический синдром, гломерулонефрит, сахарный диабет, длительный понос, кровотечения); асцит, плеврит. Лекарства: эстрогены
Гематокрит	Соотношение объема эритроцитов к объему плазмы.	<u>При увеличении объема эритроцитарной массы:</u> опухоловая трансформация стволовой клеткистимуляцияэритропоэза при вторичных эритроцитозах, опухоли почек и надпочечников, поликистоз и гидронефроз почек,Лекарства: глюкокортикоиды. <u>При уменьшении жидкой части крови:</u> обезвоживание, перитонит, Лекарства: диуретики	
Альбумин	Основной белок крови, вырабатываемый в печени Поддерживает коллоидно-осмотич. давление и транспортную функцию.	При обезвоживании	Голодание. Хронические заболевания печени (гепатит, цирроз, опухоли печени) Заболевания кишечника Сепсис, инфекционные Заболевания, нагноительные процессы Травма Лихорадка Злокачественные опухоли. Сердечная недостаточность Беременность, лактация Лекарства: эстрогены, кортикоиды
Билирубин	Образуется из гемоглобина Свободный (несвязанный,	При паренхиматозных и застойных желтухах происходит разрушение печеночных клеток, следствием	

	<p>непрямой) билирубин переносится в печень, где клетках образуется новое соединение (прямой) билирубин. В нормальных условиях нет, так как он не преодолевает барьера между клетками печени и капиллярами.</p>	<p>чего является переход прямого билирубина в кровь, а затем – в мочу. При “застойной желтухе” концентрация общего билирубина увеличивается за счет увеличения прямой фракции билирубина, а –непрямой билирубин может оставаться в норме или незначительно. В увеличиваться. Застойная желтуха отмечается в при воспалении желчного пузыря и выводящих путей, желчно-каменной болезни, опухоли желчного пузыря. При “паренхиматозной желтухе” концентрация общего билирубина увеличивается за счет прямого билирубина, что обусловлено разрушением клеток печени, в результате чего прямой билирубин поступает в кровь. При: вирусных гепатитах, токсических гепатитах, циррозах печени, метастазах опухолей в печень.</p>	
Глюкоза		<p>Сахарный диабет. Эндокринные нарушения. Острый и хронический панкреатит. Опухоли поджелудочной железы. Хронические заболевания печени и почек. Кровоизлияние в мозг. Инфаркт миокарда. Гиперфункции щитовидной железы и надпочечников. Энцефалит, заболевания гипофиза.</p>	<p>Заболевания поджелудочной железы (гиперплазия, аденома или рак). Гипотиреоз. Заболевания печени (цирроз, гепатит, рак). Рак надпочечника, рак желудка. Голодание. Заболевания желудка и кишечника (при которых нарушено всасывание глюкозы). Недостаточности функции щитовидной железы, надпочечников и гипофиза, передозировка инсулина. Заболевания ЦНС.</p>
Мочевина	Мочевина	Употребление высоко белковой	При беременности

	<p>синтезируется пищи Диета, бедная ионами в печени из хлора</p> <p>аммиака и организма: неукротимая рвота, является профузный понос и т. д. При одним из чрезмерном катаболизме белка: компонентов лейкозе, паренхиматозной остаточного желтухе, тяжелых азота. Мочевин инфекционные заболевания, а не токсична, непроходимость кишечника, а сопровождаю почек (гломерулонефрит, щий пиелонефрит); обструкция увеличение ее мочевыводящих путей (опухоли содержания мочевыводящих путей, синдром предстательной железы, интоксикации почечно-каменная обусловлен болезнь); Острая и хроническая накоплением в почечная недостаточность; Нарушения организме других выведения мочевины при продуктах. мочевыводящих путей: Мочевина, будучи осмотически активным веществом, относительно легко проходит через плазматические мембранные клеток, увлекает в клетки воду, что приводит к клеточной гипергидратации.</p>	<p>Обезвоживание и организма: неукротимая рвота, профузный понос и т. д. При чрезмерном катаболизме белка: лейкозе, паренхиматозной желтухе, тяжелых азота. Мочевин инфекционные заболевания, непроходимость кишечника, почек (гломерулонефрит, пиелонефрит); обструкция мочевыводящих путей (опухоли предстательной железы, почечно-каменная болезнь); Острая и хроническая почечная недостаточность; Нарушения выведения мочевины при заболеваниях, не связанных с заболеваниями почек и мочевыводящих путей: сердечная недостаточность, острый инфаркт миокарда; сахарный диабет с кетоацидозом, аддисонова болезнь. Лекарства: сульфаниламиды, левомицетин, тетрациклин, гентамицин, фуросемид, анаболические стероиды, кортикостероиды, тироксин</p>	<p>(вследствие физиологической гидремии); При диете с низким содержанием белка и высоким содержанием углеводов, голодании; При парентеральном введение жидкостей (вследствие гипергидратации); При пониженном катаболизме белков; При нарушении всасывания в кишечнике, целиакии; При особенно тяжелых поражениях печени (печеночная недостаточность), вызванных, в частности, отравлением фосфором, мышьяком и другими гепатотропными ядами; остром некрозе печени, печеночной коме, декомпенсированном циррозе, гепатитах</p>
Креатинин	<p>Продукт белкового обмена, позволяющий судить о состоянии почек мышечной системы человека. Креатинин является одним из</p>	<p>Высокобелковое питание. Острая и хроническая почечная недостаточность. Повреждение мышечной ткани. Гипертриеоз. Лекарства: тетрациклин, цефазолин, ибупрофен</p>	

	компонентов остаточного азота. Образуется в мышцах из креатинфосфата и мозге.		
АЛТ -Аланинамино-трансфераза	<p>Внутриклеточный фермент, катализирующий обратимый перенос аминогрупп. При повреждении клеток, богатых АлАТ (печень, мышца сердца и др.), происходит выброс этого фермента в кровяное русло. Увеличение активности АлАТ в плазме указывает скорее на повреждение клеток, чем на нарушение функции органа. Фермент не обладает органной специфичностью, поэтому уровень его сывороточной активности не всегда коррелирует с тяжестью поражения органа.</p>	<p>Вирусный гепатит. Токсическое повреждение печени. Холестаз. Цирроз печени. Рак печени (первичный и метастатический). Механическая (подпеченочная) желтуха. Шок. Гипоксия (астматическое состояние). Обширный инфаркт миокарда. Обширная травма и некроз скелетных мышц. Выраженный панкреатит. Введение гепатотоксических препаратов, длительное лечение фибраратами, большими дозами салицилатов, сульфанилмочевинными препаратами (диабетол) и др.</p>	<p>Тяжёлые поражения печени – обширный некроз, цирроз (когда значительно уменьшается количество клеток, синтезирующих АлАТ). Дефицит витамина В6.</p>
АСТ – Аспартатамино-трансфераза	Фермент, который обратимо катализирует	Инфаркт миокарда. Тромбоз легочной артерии. Гепатиты различной этиологии (вирусные, токсические).	

	трансаминирование. Содержится в мышечной ткани и практически во всех паренхиматозных органах (в митохондриях клеток). Высвобождение при глубокой деструкции клеток.	Холестаз. Травмы скелетных мышц. Миопатии. Острый панкреатит. Рак печени (первичный и метастатический).	
ГГТ - гаммаглутаминтрансфераза	Фермент, который встречается во многих паренхиматозных органах (печень, селезенка, легкие, почки, поджелудочная и щитовидные железы), участвует в обмене аминокислот. Источником сывороточной ГГТ, как правило, является гепатобилиарная система, при этом основными органами локализации фермента являются почки и поджелудочная железа.	Желчнокаменная болезнь, вирусные и токсические гепатиты. Панкреатиты, рак поджелудочной железы, при обострениях хронических заболеваний почек, При гепатокарциноме, метастазах в печень, при опухолях легких, предстательной железы.	
ЩФ – Щелочная фосфотаза	Фермент, участвующий в реакциях обмена фосфорной	Патология костной ткани (с повышением активности остеобластов или распадом костной ткани): Гиперпаратиреоз; Рахит;	Наследственная гипофосфатаземия Концентрация кальция и фосфора в сыворотке

	кислоты Источником ЩФ служат кости, кишечник, печень и плацента.	Заживление переломов; Остеосаркомы и метастазы злокачественных опухолей в кости; Заболевания печени (цирроз, некроз печёночной ткани, первичная гепатокарцинома, метастатический рак печени, инфекционные, токсические, лекарственные гепатиты, туберкулез, паразитарные поражения); Внутри- и внепечёночный холестаз (холангиты, камни желчных протоков и желчного пузыря, опухоли желчевыводящих путей); Нарушения питания (недостаток кальция и фосфатов в пище); Физиологическое : молодой возраст, беременность Гепатотоксичные препараторы: метотрексат, хлорпромазин, антибиотики широкого спектра действия, сульфаниламиды; большие дозы витамина С; магнезии.	нормальная, но очень низкая активность ЩФ в сыворотке и костях); Нарушения роста кости Гипотиреоз; Нед остаток цинка и магния в пище; Приём эстрогенов, , азатиоприна, клофибрата.
--	--	--	--

1.9 Лекция № 11 (2 часа).

Тема: «*Определение показателей иммунного статуса: иммуноглобулины G, A и M в сыворотке, T- и B-лимфоциты*»

1.9.1 Вопросы лекции:

- 1.1. Иммунный статус.
- 1.2. Оценка иммунного статуса.
- 1.3. Состояние клеточного иммунитета.

1.9.2 Краткое содержание вопросов:

1. Иммунный статус. Иммунный статус — это структурное и функциональное состояние иммунной системы индивидуума, определяемое комплексом клинических и лабораторных иммунологических показателей. Таким образом, иммунный статус (син. иммунный профиль, иммунореактивность) характеризует анатомо-функциональное состояние иммунной системы, т. е. ее способность к иммунному ответу на определенный антиген в данный момент времени. Наличие у человека иммунной системы автоматически подразумевает его способность к иммунному ответу, но сила и форма иммунного ответа на один и тот же антиген у разных людей могут варьировать в широких пределах. Поступление антигена в организм у одного человека вызывает преимущественно антителообразование, у другого — развитие гиперчувствительности, у третьего — в основном формирование иммунологической толерантности, и т. д. Иммунный ответ на один и тот же антиген у разных лиц может варьировать не только по форме, но и по силе, т. е. по степени выраженности, например, по уровню антител, устойчивости к инфекции и др. По иммунореактивности различаются не только отдельные индивидуумы, но и одного

и того же человека иммунореактивность может колебаться в различные периоды его жизни. Так, иммунный статус взрослого и ребенка, особенно новорожденного или первого года жизни, когда иммунная система еще функционально незрелая, существенно различается. У детей легче индуцировать иммунологическую толерантность, у них ниже титры сывороточных антител при иммунизации. Иммунный статус молодого и пожилого человека также различен. Это частично связано с состоянием тимуса, который рассматривается как «биологические часы» иммунной системы. Возрастная инволюция тимуса ведет к медленному угасанию Т-клеточных реакций по мере старения, снижению способности к распознаванию «своего» и «чужого», поэтому в старости, в частности, выше частота злокачественных новообразований. С возрастом нарастает также частота обнаружения аутоантител, в связи с чем старение иногда рассматривается как хронически текущая аутоагрессия. Иммунный статус подвержен не только возрастным, но и суточным колебаниям в зависимости от биоритма. Эти колебания обусловлены изменениями гормонального фона и другими причинами. Таким образом, при оценке иммунного статуса следует учитывать значительную индивидуальную вариабельность иммунологических показателей даже в норме. Иммунная система филогенетически относится к числу молодых (наряду с нервной и эндокринной) и очень лабильных к различным внешним воздействиям. Практически любое, даже самое незначительное, внешнее воздействие на организм человека ведет к изменению состояния его иммунной системы. На иммунный статус оказывают влияние следующие факторы:

- климато-географические;
- социальные;
- экологические (физические, химические и биологические);
- «медицинские» (влияние лекарственных веществ, оперативные вмешательства, стресс и т. д.).

Среди климато-географических факторов на иммунный статус оказывают влияние температура, влажность, солнечная радиация, длина светового дня и др. Например, фагоцитарная реакция и кожные аллергические пробы менее выражены у жителей северных регионов, чем у южан. Вирус Эпштейна—Барр у людей белой расы вызывает инфекционное заболевание — мононуклеоз, у лиц негроидной расы — онкопатологию (лимфома Беркитта), а у лиц желтой расы — совсем другую онкопатологию (назофарингеальная карцинома), причем только у мужчин. Жители Африки менее подвержены заболеванию дифтерией, чем европейское население.

К социальным факторам, оказывающим влияние на иммунный статус, относятся питание, жилищно-бытовые условия, профессиональные вредности и т. п. Важное значение имеет сбалансированное и рациональное питание, поскольку с пищей в организм поступают вещества, необходимые для синтеза иммуноглобулинов, для построения иммунокомпетентных клеток и их функционирования. Особенно важно, чтобы в рационе присутствовали незаменимые аминокислоты и витамины, особенно А и С. Значительное влияние на иммунный статус организма оказывают жилищно-бытовые условия. Проживание в плохих жилищных условиях ведет к снижению общей физиологической реактивности, соответственно иммунореактивности, что нередко сопровождается повышением уровня инфекционной заболеваемости. Большое влияние на иммунный статус оказывают профессиональные вредности, поскольку человек проводит на работе значительную часть своей жизни. К производственным факторам, которые могут оказывать неблагоприятное воздействие на организм и снижать иммунореактивность, относят ионизирующую радиацию, химические вещества, микробы и продукты их жизнедеятельности, температуру, шум, вибрацию и т. д. Источники радиации получили в настоящее время очень широкое распространение в различных отраслях промышленности (энергетика, горнохимическая, аэрокосмическая и др.). Неблагоприятное влияние на иммунный статус оказывают соли тяжелых металлов, ароматические, алкилирующие соединения и другие химические вещества, в том числе моющие средства, дезинфицианты,

пестициды, ядохимикаты, широко применяемые в практике. Таким профессиональным вредностям подвержены работники химических, нефтехимических, металлургических производств и др. Неблагоприятное влияние на иммунный статус организма оказывают микробы и продукты их жизнедеятельности (чаще всего белки и их комплексы) у работников биотехнологических производств, связанных с производством антибиотиков, вакцин, ферментов, гормонов, кормового белка и др. Такие факторы, как низкая или высокая температура, шум, вибрация, недостаточная освещенность, могут снижать иммунореактивность, оказывая опосредованное действие на иммунную систему через нервную и эндокринную системы, которые находятся в тесной взаимосвязи с иммунной системой. Глобальное действие на иммунный статус человека оказывают экологические факторы, в первую очередь, загрязнение окружающей среды радиоактивными веществами (отработанным топливом из ядерных реакторов, утечка радионуклидов из реакторов при авариях), широкое применение пестицидов в сельском хозяйстве, выбросами химических предприятий и автотранспорта, биотехнологических производств. На иммунный статус оказывают влияние различные диагностические и лечебные медицинские манипуляции, лекарственная терапия, стресс. Необоснованное и частое применение рентгенографии, радиоизотопного сканирования может влиять на иммунную систему. Иммунореактивность изменяется после травм и хирургических операций. Многие лекарственные препараты, в том числе антибиотики, способны оказывать побочное иммунодепрессивное действие, особенно при длительном приеме. Стресс приводит к нарушениям в работе Т-системы иммунитета, действуя, в первую очередь, через ЦНС. Несмотря на вариабельность иммунологических показателей в норме, иммунный статус можно определить путем постановки комплекса лабораторных тестов, включающих оценку состояния факторов неспецифической резистентности, гуморального (В-система) и клеточного (Т-система) иммунитета.

2. Оценка иммунного статуса. Оценка иммунного статуса проводится в клинике при трансплантации органов и тканей, аутоиммунных заболеваниях, аллергиях, для выявления иммунологической недостаточности при различных инфекционных и соматических заболеваниях, для контроля эффективности лечения болезней, связанных с нарушениями иммунной системы.

В зависимости от возможностей лаборатории оценка иммунного статуса чаще всего базируется на определении комплекса следующих показателей:

- общего клинического обследования;
- состояния факторов естественной резистентности;
- гуморального иммунитета;
- клеточного иммунитета;
- дополнительных тестов.

При общем клиническом обследовании учитывают жалобы пациента, анамнез, клинические симптомы, результаты общего анализа крови (включая абсолютное число лимфоцитов), данные биохимического исследования. Знакомство врача с пациентом начинается, как правило, с ознакомления с его паспортными данными (возраст) и предъявляемыми жалобами. Уже на этом этапе врач может узнать о профессии и стаже работы пациента (наличие профессиональных вредностей). Из высказываемых жалоб следует обратить внимание на рецидивирующую оппортунистическую инфекцию, аллергию. При сборе анамнеза важно выяснить, какие заболевания перенес пациент в детстве, особенно вирусные и паразитарные, часто оставляющие после себя иммунодефициты. Учитывают наличие наследственных заболеваний, аллергий, злокачественных новообразований. Полезно также расспросить пациента о перенесенных травмах и операциях, о наличии хронических соматических заболеваний и тех лекарственных препаратах, которые он принимает. При осмотре больного обращают внимание на чистоту кожных покровов и слизистых, на которых можно обнаружить проявления оппортунистических инфекций, аллергии. При пальпации и перкуссии уделяют внимание

состоянию центральных (тимус) и периферических (лимфатические узлы, селезенка) органов иммунной системы, их размерам, спаянности с окружающими тканями, болезненности при пальпации. В процессе перкуссии и аускультации фиксируют симптомы, характерные для оппортунистических инфекций при поражении внутренних органов. Заканчивается клинический раздел обследования общим анализом крови, который дает представление о состоянии иммунокомпетентных клеток (абсолютное число лимфоцитов, фагоцитов). При оценке состояния факторов естественной резистентности определяют фагоцитоз, комплемент, интерфероновый статус, колонизационную резистентность. Функциональную активность фагоцитов определяют по их подвижности, адгезии, поглощению, дегрануляции клеток, внутриклеточному киллингу и расщеплению захваченных частиц, образованию активных форм кислорода. С этой целью используют такие тесты, как определение фагоцитарного индекса, НСТ-тест (нитросиний тетразолий), хемилюминисценцию и др. Состояние системы комплемента определяют в реакции гемолиза (результат учитывают по 50%-му гемолизу). Интерфероновый статус выявляют путем титрования на культуре клеток уровня интерферона в сыворотке крови. Колонизационную резистентность определяют по степени дисбиоза различных биотопов организма (чаще всего толстой кишки). Гуморальный иммунитет определяют по уровню иммуноглобулинов классов G, M, A, D, E в сыворотке крови, количеству специфических антител, катаболизму иммуноглобулинов, гиперчувствительности немедленного типа, показателю В-лимфоцитов в периферической крови, бласттрансформации В-лимфоцитов под действием В-клеточных митогенов и другим тестам. Для определения концентрации иммуноглобулинов разных классов в сыворотке крови обычно используют радиальную иммунодиффузию по Манчини. Титр специфических антител (изогемагглютинины групп крови, антитела, образующиеся после вакцинации, естественные антитела) в сыворотке определяют в различных иммунологических реакциях (агглютинация, РПГА, ИФА и другие тесты). Для определения катаболизма иммуноглобулинов используют радиоизотопные метки. Число В-лимфоцитов в периферической крови устанавливают путем определения специфических рецепторов на клетках с помощью моноклональных антител (клластерный анализ) или в реакции розеткообразования (ЕАС-РОК эритроциты в присутствии антител и комплемента образуют розетки с В-лимфоцитами). Функциональное состояние В-лимфоцитов определяют в реакции бласттрансформации путем стимуляции клеток митогенами, такими как туберкулин, лаконас и др. При оптимальных условиях культивирования В-лимфоцитов с митогенами показатель трансформации в бласты может достигать 80%. Подсчет бластов проводят под микроскопом, с использованием специальных гистохимических методов окраски или же с помощью радиоактивной метки — по включению в ДНК клетки тимицина, меченного тритием.

3. Состояние клеточного иммунитета. Состояние клеточного иммунитета оценивают по количеству Т-лимфоцитов, а также субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови, бласттрансформации Т-лимфоцитов под действием Т-клеточных митогенов, определению гормонов тимуса, уровню сек-ретируемых цитокинов, а также постановкой кожных проб с аллергенами, контактной сенсибилизацией динитрохлорбензолом. Для постановки кожных аллергических проб используются антигены, к которым в норме должна быть сенсибилизация, например проба Манту с туберкулином. Способность организма к индукции первичного иммунного ответа может дать контактная сенсибилизация динитрохлорбензолом. Для определения числа Т-лимфоцитов в периферической крови используют реакцию розеткообразования Е-РОК, поскольку эритроциты барабана образуют с Т-лимфоцитами спонтанные розетки, а для определения числа субпопуляций Т-лимфоцитов — реакцию розеткообразования ЕА-РОК. Реакции розеткообразования используют в связи с тем, что на мембране Т-хелпера имеется рецептор к Fc-фрагменту иммуноглобулина M, а на мембране Т-супрессора — рецептор к Fc-фрагменту иммуноглобулина G, поэтому Т-хел-перы образуют розетки с

эритроцитами, связанными с антиэритроцитарными антителами класса IgM, а супрессоры образуют розетки с эритроцитами, связанными с антиэритроцитарными антителами класса IgG. Однако реакции розеткообразования для дифференциации Т-лимфоцитов уступили место более точному и современному методу определения популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов — кластерному анализу, основанному на использовании моноклональных антител к рецепторам лимфоцитов. После определения числа субпопуляций Т-лимфоцитов рассчитывают соотношение хелперов и супрессоров, т. е. Т4/Т8 лимфоцитов, которое в норме составляет примерно 2. Бласттрансформацию Т-лимфоцитов, т. е. их функциональную активность, определяют путем стимуляции Т-клеточными митогенами, такими как кон-канавалин А или фитогемагглютинин. Под влиянием митогенов зрелые лимфоциты трансформируются в лимфобласты, которые можно подсчитать под микроскопом или обнаружить по радиоактивной метке. Для оценки состояния функции тимуса чаще всего применяют определение уровней аll-тимозина и ти-мулина, являющихся отражением функции эпителиальных клеток стромы тимуса. Для определения уровня секретируемых иммуноци-токинов (интерлейкины, миелопептиды и др.) используют иммуноферментные методы, основанные на применении моноклональных антител к двум различным эпитопам цитокина. С этой целью можно также применять реакцию торможения миграции лейкоцитов. В качестве дополнительных тестов для оценки иммунного статуса можно использовать такие тесты, как определение бактерицидности сыворотки крови, титрование С3-, С4-компонентов комплемента, определение содержания С-реактивного белка в сыворотке крови, определение ревматоидных факторов и других аутоантител.

Тесты 1-го уровня

1. Определение количества, морфологии Т- и В-лимфоцитов в лимфоидных органах периферической крови (абс. и %)
2. Кластерный анализ или ЕАС-розеткообразование
3. Определение сывороточных иммуноглобулинов классов М. (J, A, D, E
4. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов
5. Кожные аллергические тесты
6. Рентгенография и рентгеноскопия лимфоидных органов, а также других внутренних органов (прежде всего легких) в зависимости от клинических показаний

Тесты 2-го уровня

1. Гистохимический анализ мононукле-арных клеток с использованием моноклональных антител
2. Анализ поверхностных маркеров мононукле-арных клеток с использованием моноклональных антител
3. Бласттрансформация В и Т-лимфопитов
4. Определение цитотоксичности
5. Определение активности ферментов, ассоциированных с иммунной недостаточностью
6. Определение синтеза и секреции цитокинов
7. Определение гормонов тимуса
8. Анализ респираторного взрыва фагоцитов
9. Определение компонентов комплемента
10. Анализ смешанных клеточных культур

Оценка иммунного статуса проводится на основании постановки большого числа лабораторных тестов, позволяющих оценить состояние как гуморального и клеточного звеньев иммунной системы, так и факторов неспецифической резистентности. Очевидно,

что некоторые из применяемых тестов сложны в исполнении, требуют дорогостоящих иммунохимических реагентов, современного лабораторного оборудования, а также высокой квалификации персонала, в связи с чем они выполнимы ограниченным числом лабораторий. Поэтому по рекомендации Р. В. Петрова все тесты разделены на две группы: тесты 1-го и 2-го уровня. Тесты 1-го уровня могут быть выполнены в любой клинической иммунологической лаборатории первичного звена здравоохранения, они используются для первичного выявления лиц с явно выраженной иммунопатологией. Для более точной диагностики используются тесты 2-го уровня.

1. 10 Лекция № 12 (2 часа).

Тема: «Оценка иммунного статуса»

1.10.1 Вопросы лекции:

- 1.1. Нейтрофилы: нарушения функций, общие сведения
- 1.2. Лейкоциты: наследственные нарушения адгезии лейкоцитов
- 1.3. CD: экспрессия и этапы гемопоэза, введение

1.10.2 Краткое содержание вопросов:

1. Нейтрофилы: нарушения функций, общие сведения

Заболевания сгруппированы в соответствии с тем, какая из функций фагоцитов нарушена: адгезия, хемотаксис или бактерицидная активность. Дисфункции нейтрофилов, такие как различные формы нейтропении, дефицит адгезии нейтрофилов или хронический грануломатоз, приводят к тяжелым формам подверженности больных бактериальным инфекциям, что подчеркивает ключевую роль нейтрофилов в обеспечении врожденной формы иммунитета. С другой стороны, гиперактивация нейтрофилов также приводит к патологиям. Такие аномалии, как повреждение при реперфузии, васкулит, синдром дыхательной недостаточности взрослых, или гломерулонефрит, свидетельствуют о важном медицинском значении гиперактивации нейтрофилов.

2. Лейкоциты: наследственные нарушения адгезии лейкоцитов

Описаны два типа наследственных нарушений адгезии лейкоцитов. Оба наследуются аутосомно-рецессивно и ведут к неспособности нейтрофилов выйти из кровеносного русла в очаг инфекции. В результате возникают стойкий лейкоцитоз и предрасположенность к инфекциям. В основе синдрома недостаточной адгезии лейкоцитов типа 1 лежат мутации гена, кодирующего CD 18, общую для бета2-интегринов субъединицу. В итоге нарушается плотная адгезия нейтрофилов к эндотелиальным клеткам. Кроме того, альфаM бета2- интегрин (CD11b/CD18) служит рецептором (CR3) для опсонина С3Ы - фрагмента компонента комплемента. Ген, кодирующий CD 18, расположен в дистальном отделе длинного плеча 21-й хромосомы. Клиническая картина зависит от экспрессивности мутантного гена, а она может быть различной. В самом тяжелом случае молекулы адгезии полностью отсутствуют на неактивированных нейтрофилах и не появляются ни на нейтрофилах, ни на активированных Т- и В-лимфоцитах под влиянием провоспалительных цитокинов. Возникающие в результате функциональные нарушения представить нетрудно, поскольку роль молекул адгезии для нормальной функции лейкоцитов хорошо известна. У нейтрофилов и моноцитов снижается способность прилипать к эндотелиальным клеткам и покрытой белком поверхности, а также способность к распластыванию, агрегации и хемотаксису. Заболевание проявляется рецидивирующими бактериальными и рецидивирующими грибковыми инфекциями (легких, кишечника, кожи, слизистой рта и слизистой половых органов) и стойким лейкоцитозом до 15000-20000 1/мкл. В тяжелых случаях в анамнезе обычно есть указание на позднее отпадение пуповины. Инфекции, прежде всего кожи, часто осложняются некрозом с быстрым ростом очага поражения,

медленным заживлением и формированием уродливых рубцов. Основные возбудители - *Staphylococcus aureus* и энтеробактерии. Синдром недостаточной адгезии лейкоцитов типа 2 обусловлен дефектом sCD15 - сиалированного антигена Lex. Этот поверхностный гликопротеид служит лигандом для селектинов эндотелиальных клеток. Хемотаксис: нарушения хемотаксиса нейтрофилов и моноцитов. Нарушение хемотаксиса нейтрофилов и нарушение хемотаксиса моноцитов наблюдается при синдроме гиперпродукции IgE (синдроме Иова). Причина заболевания неизвестна. В ряде случаев оно наследуется аутосомно-доминантно. У больных отмечаются грубые черты лица, выпуклый лоб, гипертelorизм, кифосколиоз, остеопороз и зудящие дерматиты. Часто развиваются синусит, пневмония и кожные инфекции, все со слабо выраженной местной воспалительной реакцией (холодные абсцессы). Состояние больного может быть удовлетворительным несмотря на тяжелую инфекцию, и для ее диагностики необходима высокая настороженность.

Ослабленную местную воспалительную реакцию долгое время считали результатом нарушенного хемотаксиса, когда единичные фагоциты с большим опозданием достигают очага инфекции, и приписывали ее влиянию фактора, угнетающего миграцию макрофагов. Сейчас ясно, что хемотаксис при этом заболевании бывает нарушен в разной степени, а в основе ослабления защитных сил организма лежит не одна, а целый комплекс причин, пока недостаточно изученных.

Самое распространенное из нарушений функции нейтрофилов - недостаточность миелопероксидазы. Заболевание наследуется аутосомно-рецессивно. Распространенность его составляет примерно 1:2000. В отсутствие других заболеваний, ослабляющих защитные силы организма, прежде всего - некомпенсированного сахарного диабета, недостаточность миелопероксидазы не проявляется. Ее компенсируют прочие антимикробные системы фагоцитов, например, увеличивается образование перекиси водорода. Бактерицидное действие нейтрофилов запаздывает, но не исчезает полностью. Когда недостаточность миелопероксидазы сочетается с сахарным диабетом, сопротивляемость инфекциям снижается значительно. Приобретенная недостаточность миелопероксидазы наблюдается при остром миелобластном лейкозе и остром миеломонобластном лейкозе.

3. CD: экспрессия и этапы гемопоэза, введение.

Этапы дифференцировки и созревания клеток миелоидного ряда определяют по морфологическим признакам. Для В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов процесс дифференцировки подразделяют на этапы, соответствующие перестройкам и экспрессии генов их антигенраспознающих рецепторов - мембранных Ig и TcR, соответственно. На практике для этой цели, в основном, используются фенотипические признаки - экспрессия ряда поверхностных маркеров, в том числе некоторых CD. Так, наиболее ранние предшественники клеток крови экспрессируют CD34. CD: экспрессия и этапы гемопоэза, Т-лимфоциты

В отличие от всех остальных клеток крови дифференцировка Т-лимфоцитов происходит в тимусе. Предполагают, что мигрировавшие из костного мозга предшественники Т-клеток достигают тимуса на стадии протимоцита (про-Т-лимфоциты). На поверхности про-Т-лимфоцитов экспрессируются CD44 и CD7, а в цитоплазме - CD3. Экспрессия этих маркеров начинается еще в костном мозге и не зависит от тимусного микроокружения. Следующая стадия созревания ранних тимоцитов характеризуется поверхностной экспрессией CD1, CD38 и, возможно, CD2. На стадии дифференцировки тимоцита выявляется экспрессия CD4, CD5, CD8. Для определения различных стадий Т-клеточной дифференцировки экспрессия CD4 и CD8 вместе с CD3 является наиболее информативной.

Ранние предшественники Т-клеток определяются как С04минусС08минус (дважды негативные)С0Зминус. Их ближайшие потомки начинают экспрессировать низкие уровни CD4 и CD8, дифференцируясь затем в С04плюсС08плюс(дважды позитивные), оставаясь

при этом СОЗминус. Начиная экспрессировать CD3/TcR, С04плюсС08плюс, тимоциты подвергаются внутритимусной селекции, пройдя которую прекращают экспрессию либо CD4, либо CD8, а также CD1, и вступают, таким образом, в последнюю внутритимусную стадию дифференцировки - зрелого тимоцита. Покиая тимус, они становятся зрелыми периферическими Т-клетками, которые подразделяются на две популяции: CD4nniocTcR/CD3nnioc Т-хелперы и CD8плюсTcR/CD3плюс Т-киллеры/супрессоры\Т-лимфоциты: CD8nnK>cTcR/CD3mnc Т-киллеры. Кроме CD3, CD4 или CD8 многие периферические Т-клетки продолжают экспрессировать CD5, CD6, CD7, CD27 и CD28. В-лимфоциты: экспрессия CD и этапы гемопоэза

В отличие от Т-клеток, предшественники которых мигрируют в тимус, В-клетки все стадии антигеннезависимой дифференцировки проходят в костном мозге. На поверхности предшественников В-лимфоцитов, про-В-лимфоцитов, обнаруживают ряд CD, однако данные об их экспрессии противоречивы. Наиболее ранние про-В-клетки часто определяют как CD 19iunocCD 1 Оплюс-клетки, не экспрессирующие генов тяжелых цепей иммуноглобулинов, но экспрессирующие антигены МНС класса II. Возможными кандидатами для определения про-В-клеток являются CD9, а также CD24: экспрессия CD24 (как и CD 10) не ограничена клетками В-ряда, но ее уровень на ранних этапах дифференцировки повышен. CD 19 является наиболее универсальным маркером клеток В-лимфоцитарного ряда (так называемый пан-В) - он обнаруживается уже на поверхности В-клеток эмбриональной печени и не экспрессируется только терминально дифференцированными плазматическими клетками. Аналогично CD 19 экспрессируется другой пан-В-маркер - CD72, являющийся рецептором CD5, но он пока мало изучен.

Следующий этап дифференцировки - пре-В-лимфоциты - определяется, главным образом, по цитоплазматической экспрессии мю-цепи иммуноглобулина. На этом же этапе начинается экспрессия (слабая) CD20 и, по-видимому, CDw78. CD20 - еще один пан-В-маркер, как и CD 19, часто использующийся для идентификации В-клеток. Параллельно появляется CD21. Начало поверхностной экспрессии IgM свидетельствует о появлении незрелых В-клеток. Одновременно начинается поверхностная экспрессия CD22, на предыдущих этапах обнаруживающаяся, только в цитоплазме. Примерно в это же время на поверхности В-клеток появляется еще несколько антигенов - CD37, CD39, CD40. На поверхности незрелых В-клеток обнаруживается также ряд дифференцировочных антигенов: CD73, CD74, CDw75 и CD76. Следующий этап - зрелые или покоящиеся В-клетки характеризуются одновременной экспрессией поверхностных IgM и IgD. Параллельно с IgD экспрессируется CD23.

Дальнейшая дифференцировка проходит в периферических клетках крови или лимфоидных органах и вызывается антигеном. Она характеризуется увеличением размеров В-клеток и повышением уровня экспрессии антигенов МНС класса II. Это стадия активированных В-клеток. Антигензависимая дифференцировка вызывает замену поверхностных IgM/IgD другим изотипом (который будет позднее секретироваться) и деление, что свидетельствует о вступлении в стадию В-бластов, или пролиферирующих В-клеток. Последние могут дифференцироваться либо в плазматические клетки, либо в В-клетки памяти. Плазматические клетки теряют поверхностную экспрессию большинства специфических В-клеточных маркеров (в том числе поверхностный Ig). Однако они опять начинают экспрессировать CD38 и, кроме того, сильно отличаются от В-клеток морфологически.

Процесс созревания и дифференцировки В-клеток, особенно последние его стадии, не всегда одинаково подразделяются на этапы.

Гемобластозы: и дифференцировочные CD антигены

Опухоли гемопоэтической системы представляют собой наиболее яркий пример сохранения дифференцировочного статуса нормальных клеток при их опухолевой трансформации. Так, самая детальная классификация лейкозов и лимфом основана на их

иммунофенотипировании, т.е. на сохранении ими дифференцировочных CD-антител (CD-cluster differentiation), характеризующих определенное направление и стадию дифференцировки клеток кроветворной системы [Stevenson G.T and Cragg M.S., 1999]. Более того, некоторые дифференцировочные антигены, такие как С ALLA (CD 10), были первоначально обнаружены в лейкозах и рассматривались как специфические опухолевые антигены и лишь впоследствии они были выявлены на быстропреходящих стадиях нормальной дифференцировки [Greaves M.F. and Janossy G., 1978].

Случаи сочетания дифференцировочных антигенов разных клеточных линий в некоторых низкодифференцированных острых лейкозах также оказались соответствующими ранним стадиям дифференцировки гемопоэтических клеток, в которых еще не установилась определенная программа дальнейшего развития и присутствуют элементы разных линий гемопоэтической дифференцировки [Enver T. and Greaves M.F., 1998].

Лейкоз (лейкемия).

Лейкоз (лейкемия, устаревшее название белокровие) - общее название опухолевых заболеваний кроветворной ткани с поражением костного мозга, при которых повышается количество некоторых видов лейкоцитов и вытесняются нормальные ростки кроветворения.

Острый лейкоз характеризуется увеличением количества наиболее "молодых" элементов крови - клетки бластных клеток. В зависимости от морфологических и цитохимических особенностей этих клеток различают миелобластный, лимфобластный лейкозы и др. Лейкемии и лимфомы - опухоли клеток крови и иммунной системы, другое более современное название - лейкоз.

По морфологическим, цитохимическим и иммунофенотипическим признакам бластные клетки могут быть отнесены к гранулоцитарному, лимфоидному или эритроидному ряду. От других клеток крови и костного мозга бластные клетки отличаются строением ядра. Хроматин у них состоит из нитей равномерного калибра и окраски, благодаря чему структура ядра напоминает тонкое кружево. Другой характерный признак бластной клетки - наличие крупных ядрышек (2-5 на одну клетку).

Миелобластам и монобластам свойственны такие признаки, как азурофильные гранулы, палочки Ауэра, складчатость ядерной оболочки.

Бластные клетки - наиболее "молодые" элементы крови, ктам главного комплекса гистосовместимости.

1. 11 Лекция № 13 (2 часа).

Тема: «Бактериологический метод микробиологической диагностики»

1.11.1 Вопросы лекции:

1. 1. Бактериологические методы.
- 1.2. Методы микробиологической диагностики бактериальных инфекций.
- 1.3. Контроль качества лабораторных исследований.

1.11.2 Краткое содержание вопросов:

1. Бактериологические методы. Классическое бактериологическое (вирусологическое, микологическое) исследование (называемое «золотым стандартом» микробиологической диагностики). Его целью является выделение и идентификация возбудителя. Алгоритм бактериологического (вирусологического, микологического) исследования складывается из следующих основных этапов:

- 1) первичная микроскопия (необязательный);
- 2) первичный посев для выделения чистой культуры;
- 3) накопление чистой культуры;

4) изучение комплекса биологических свойств выделенной культуры и ее идентификация. Идентификацию чистых культур (до вида микроорганизма) проводят с учётом морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, токсигенных и антигенных свойств микроорганизма. Большинство исследований включает определение чувствительности к антимикробным препаратам у выделенного возбудителя. Для эпидемиологической оценки роли микроорганизма проводят внутривидовую идентификацию определением фаговаров, биоваров, резистентваров и т.д. Классическое микробиологическое исследование имеет ряд недостатков. Прежде всего, это достаточно длительный процесс. Его минимальный срок 3-4 дня, но могут пройти многие дни и даже недели, прежде чем выделенный возбудитель будет точно идентифицирован. Для некоторых патогенных бактерий (холерного вибриона, дифтерийных бактерий) разработаны ускоренные методы выделения и идентификации, но и они позволяют получить ответ не ранее 36-48 часов. Задача микробиологических исследований — выделить из исследуемого материала микроорганизмы и идентифицировать, то есть определить их видовую принадлежность. Основой микробиологических исследований является бактериологический метод диагностики, суть которого — выделение микроорганизмов в чистой культуре и их идентификация.

Для идентификации микроорганизмов изучают следующие свойства:

1. Морфологические
2. Тинкториальные
3. Культуральные
4. Биохимические
5. Патогенные: ферменты патогенности — лецитиназа, плазмокоагулаза и пр.; токсигенность — способность продуцировать экзотоксины (дифтерийная палочка, золотистый стафилококк) (подробно вопрос был рассмотрен в предыдущем семестре, см. тему «Инфекция. Патогенность и вирулентность микроорганизмов»)
6. Антигенные (серологические) (подробно вопрос был рассмотрен в темах раздела «Иммунитет», см. предыдущий семестр)
7. Фаголизабельность — способность лизироваться бактериофагами (вирусами бактерий): чувствительность к лечебным фагам (для лечения инфекционного заболевания) и чувствительность к диагностическим фагам (в дровым, типовым); фаготипирование — определение чувствительности к типовым фагам, проводится с целью определения источника и путей распространения микроорганизмов в окружающей среде или среди коллектива (подробно вопрос был рассмотрен в теме «Бактериофагия», см. соответствующую тему)
8. Бактерициочувствительность и бактериоциногенность: проводиться с целью определения источника и путей распространения микроорганизмов в окружающей среде или среди коллектива (см. тему «Генетика бактерий»)
9. Чувствительность к антимикробным препаратам: антибиотикам, химиотерапевтическим препаратам и антисептикам (для лечения инфекционного заболевания, тема «Антибиотики»), дезинфектантам (для выбора режима дезинфекции, см. тему «Асептика, антисептика. Дезинфекция, стерилизация»).

Основной недостаток бактериологического метода — длительность исследования — от 3 до 5 суток, а в отдельных случаях и более.

Результаты многих диагностических исследований на предмет обнаружения возбудителей в значительной степени зависят от их вида, а также от времени и способа взятия патологического материала. Характер материала определяется клиническими особенностями заболевания: это должны быть те субстраты или биологические жидкости, в которых на данной стадии заболевания наиболее вероятно присутствие возбудителей. Успех проведения бактериологического метода во многом зависит от предварительного этапа, включающего забор исследуемого материала и его транспортировку, оформление

направления в бактериологическую лабораторию. Ведущим методом микробиологической диагностики является бактериологический метод, так как он позволяет выделять и идентифицировать микроб-возбудитель, т.е. первопричину болезни. Остальные методы менее информативны, так как они позволяют обнаружить в организме изменения, обусловленные наличием в нем микробы. Второе место по значимости занимает серологический метод, поскольку взаимодействие антигена и антитела характеризуется высокой степенью специфичности. Информативность трех остальных методов невысокая, и они обычно служат дополнением к бактериологическому и серологическому методам. Так, микроскопия исследуемого материала далеко не всегда позволяет увидеть и идентифицировать микробы под микроскопом. Их удается обнаружить только при высокой обсемененности ими материала. Даже обнаружив бактерии под микроскопом, идентифицировать их до вида морфологически нельзя. Как известно, все видовое многообразие бактерий сводится к 4 основным морфологическим формам: кокки, палочки, извитые и ветвящиеся формы. Поэтому по микроскопической картине можно весьма ориентировочно отнести увиденные бактерии к крупному таксону, например грамположительным коккам. Только в единичных случаях, когда бактерии имеют уникальную морфологию, микроскопически можно определить их родовую принадлежность. Информативность микроскопического метода грибов и простейших выше, так как грибы и простейшие, являясь эукариотами, имеют более крупные размеры и более характерную морфологию. Диагностические возможности биологического метода ограничены тем, что к большинству возбудителей антропонозных инфекций человека лабораторные животные невосприимчивы, поэтому вызвать у них экспериментальную инфекцию не представляется возможным.

2. Методы микробиологической диагностики бактериальных инфекций.

В бактериологии для обнаружения возбудителя в исследуемом материале используют бактериоскопический, бактериологический, биологический методы. Достоинствами бактериоскопического метода являются простота, быстрота, экономичность. Однако он находит ограниченное применение, так как может быть использован лишь при наличии каких-либо морфологических или тинкториальных особенностей возбудителя и достаточном его содержании в исследуемом материале. Данный метод является ориентировочным. Основной и самый точный метод диагностики бактериальных инфекций бактериологический, который используют почти при всех заболеваниях, несмотря на его недостатки: длительность исследования (от 4-5 дней до 2 мес), опасность (так как накапливается чистая культура возбудителя), сравнительную дороговизну. В том случае, если в исследуемом материале предполагается содержание возбудителя в достаточном количестве, посев материала производят на плотные питательные среды для получения изолированных колоний. При незначительном содержании микробов исследуемый материал прежде засевают на жидкие питательные среды - среды обогащения. Идентификацию выделенной чистой культуры производят по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим, антигенным и токсигенным свойствам (в зависимости от вида возбудителя). Определение перечисленных свойств позволяет установить вид возбудителя. С целью эпидемиологического маркирования производят внутривидовую идентификацию выделенной культуры: определяют ее фаговар, биовар и др. Кроме того, для назначения рационального лечения, как правило определяют чувствительность выделенной культуры к антибиотикам. При микробиологической диагностике заболеваний, вызванных условно-патогенными микробами, представителями нормальной микрофлоры, обязательным является определение количества возбудителей в исследуемом материале.

Биологический метод неэкономичен, негуманен, поэтому находит ограниченное применение. В качестве экспериментальных животных используют белых мышей, морских свинок, кроликов, обезьян и других животных. Диагноз инфекционного заболевания возможно установить также с помощью серологического метода,

позволяющего обнаружить либо специфические антитела в сыворотке больного, либо специфические антигены непосредственно в исследуемом материале. Антитела к возбудителю заболевания появляются, как правило, к концу первой недели болезни. Невозможность обнаружить их в первые дни заболевания является серьезным недостатком метода, особенно в тех случаях, когда заболевание протекает остро. Кроме того, при многих болезнях требуются изучение антителообразования в динамике и выявление увеличения количества антител, что также не позволяет быстро поставить диагноз. Недостатком метода является и то, что с его помощью нельзя точно идентифицировать возбудителя и определить его антибиотикограмму. Но в то же время это совершенно безопасный, относительно недорогой метод, позволяющий за короткое время поставить диагноз. В настоящее время при ряде болезней определяют не только количество, но и классы иммуноглобулинов. При некоторых заболеваниях серологический метод применяют для выявления специфических антигенов в исследуемом материале. Поскольку специфические антигены, входящие в состав возбудителя, находятся в патологическом материале с первых минут болезни, этот вариант серологического метода применяют для ускоренной (в течение первого дня болезни) или даже экспрессдиагностики (в течение нескольких часов) инфекционных заболеваний. В качестве вспомогательного при небольшой группе инфекционных заболеваний используют аллергологический метод, позволяющий, выявить повышенную чувствительность к специальному антигену (аллергену), которым является возбудитель заболевания.

3. Контроль качества лабораторных исследований.

Важным элементом работы микробиологической и иммунологической лаборатории является получение точных и сопоставимых результатов анализов, для чего необходимо осуществлять контроль качества проводимых исследований. Контроль качества может быть внутрилабораторным и внешним.

Внутрилабораторный контроль качества - система контрольных мер, которые проводятся в отдельной лаборатории персоналом этой лаборатории и направлены на обеспечение соответствующего качественного уровня работы лаборатории.

Внешний контроль качества - система контрольных мер, которые проводятся в рамках единой Федеральной системы внешней оценки качества (ФСВОК) лабораторных исследований группами экспертов и направлены на обеспечение правильной организации технологических процессов производства лабораторных исследований.

Федеральная система внешней оценки качества лабораторных исследований состоит из разделов, в рамках каждого из которых

выполняется оценка качества определенного вида лабораторных исследований. В структуру ФСВОК входят экспертные группы по разработке и проведению внешнего контроля качества в различных видах лабораторных исследований.

Исследование бактерий имеет большое практическое значение для человека. На сегодняшний день открыто большое количество прокариот, которые отличаются друг от друга по патогенности, области распространения, форме, размерам, количеству жгутиков и другим параметрам. Чтобы детально изучить данный штамм, применяется бактериологический метод исследования. Какие существуют методы анализа бактериальных клеток? Чтобы определить, являются ли бактерии патогенными, проводят исследование культуры различными способами. Среди них: 1. Бактериоскопический метод. 2. Бактериологический метод. 3. Биологический метод. Бактериоскопический и бактериологический методы исследования основаны непосредственно на работе с клетками прокариот, когда биологический анализ требуется для изучения влияния таких клеток на живой организм подопытных животных. По степени проявления тех или иных признаков заболевания ученый может сделать вывод о наличии или отсутствии патогенных бактерий в пробе, а также естественно их размножить в организме животного для получения их культуры и использования в других работах. Бактериологический метод

исследования отличается от бактериоскопического. В первом для анализа используется специально подготовленная культура живых прокариот, когда во втором проводится работа с мертвыми или живыми клетками на предметном стекле. Этапы бактериологического метода исследования. Микробиология Принцип изучения свойств бактериальной культуры может пригодиться как для ученых-микробиологов, которые поставили цель исследовать прокариотические клетки, так и для лаборантов, задача которых заключается в установлении патогенности или непатогенности бактерий, а затем диагноза пациента.

Методика изучения бактерий делится на три этапа: 1. Выделение бактерий из первоначальной пробы. 2. Высевание бактерий и выращивание чистой культуры, изучение ее свойств. 3. Детальное исследование бактериальных клеток. Первый этап. Проба, или мазок, берется со свободной поверхности среды или у пациента. Таким образом, мы получаем «коктейль» из множества видов бактерий, которые должны выселяться на питательную среду. Иногда появляется возможность выделить сразу необходимые бактерии, зная их очаги распространения в организме. Через двое-трое суток отбираются нужные колонии и высеваются на твердые среды чашек Петри с помощью стерильной петли. Во множестве лабораторий работают с пробирками, где может находиться твердая или жидкая питательная среда. Так и проводится бактериологический метод исследования в микробиологии.

Второй этап. После получения отдельных колоний бактерий проводится непосредственный макро- и микроанализ. Измеряются все параметры колоний, определяется цвет и форма каждой из них. Нередко проводится подсчет колоний на чашке Петри, а затем в исходном материале. Это имеет значение при анализе патогенных бактерий, от числа которых зависит степень заболевания. Бактериологический метод исследования. 2 этап которого заключается в изучении отдельных колоний микроорганизмов, может быть сопряжен с биологическим способом анализа бактерий. Еще одна цель работы на этом этапе – увеличить количество исходного материала. Это можно сделать на питательной среде, а можно провести эксперимент в естественных условиях на живых подопытных организмах. Патогенные бактерии будут размножаться, и в результате кровь будет содержать миллионы клеток прокариот. Из взятой крови легко приготовить необходимый рабочий материал бактерий.

Третий этап. Самая важная часть исследования – это определение морфологических, биохимических, токсигенных и антигенных свойств культуры бактерий. Работа ведется с заранее «очищенными» культурами на питательной среде, а также с препаратами (зачастую окрашенными) под микроскопом. Установить принадлежность патогенных или условно-патогенных бактерий к той или иной систематической группе, а также определить их устойчивость к лекарствам позволяет бактериологический метод исследования. 3 этап – антибиотики, т. е. анализ поведения клеток бактерий в условиях содержания лекарственных препаратов в окружающей среде. Исследование устойчивости культуры к антибиотику имеет важное практическое значение, когда необходимо прописать для конкретного пациента необходимые, а главное, действенные препараты. Здесь и может помочь бактериологический метод исследования.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа № 1 (2 часа).

Тема: Нозологическая оценка лабораторного теста. Определение диагностической чувствительности и специфичности.

2.1.1 Цель работы:

1. Ознакомиться с методами нозологической оценки лабораторного теста.
2. Овладеть методами, определения диагностической чувствительности и специфичности.

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить статистические принципы в лабораторных исследованиях.
2. Определить допустимые погрешности лабораторных методов исследования.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Лабораторные показатели биологических жидкостей пациента.

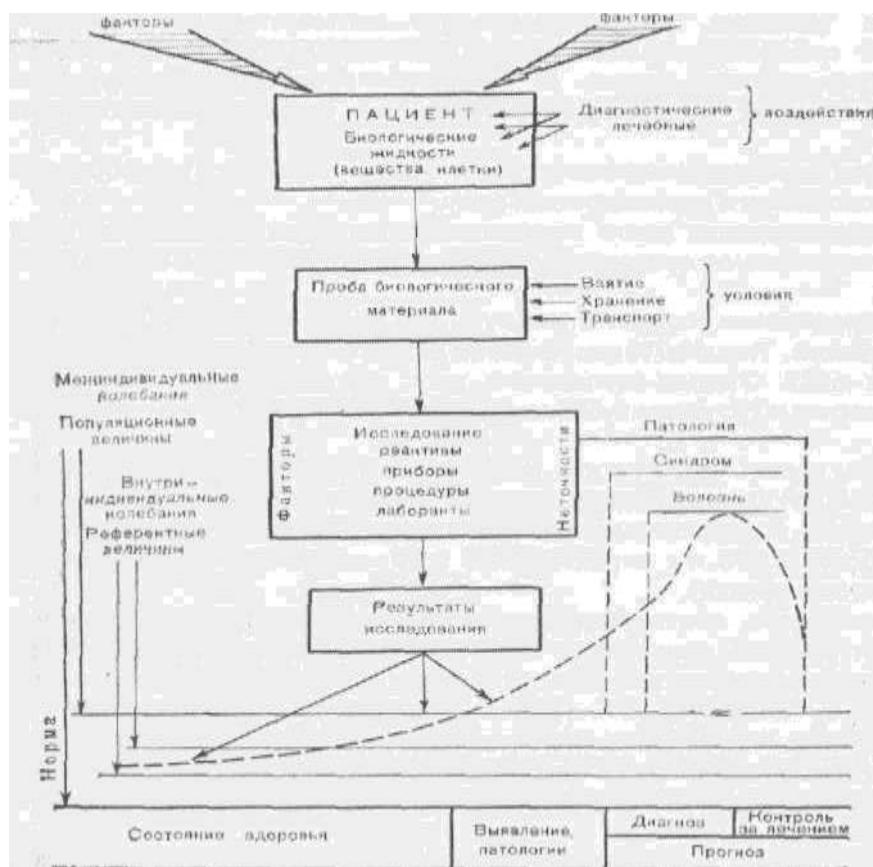
2. Калькулятор.

3. Таблица критериев Стьюдента.

2.1.4 Описание (ход) работы:

Статистические принципы в лабораторных исследованиях

Выявление патологии лабораторными средствами состоит в обнаружении отличия лабораторных показателей исследуемых компонентов биологических жидкостей пациента от нормальных их значений. Однако, как при измерении любого другого процесса в живой природе, при объективной оценке химического и клеточного состава биологических жидкостей следует учитывать изменчивость биологических систем и колебания их параметров.



Факторы» влияющие на результаты лабораторной диагностики.

Результат лабораторного исследования является случайной величиной, так как отражает влияние туда факторов. К их числу относятся: 1) биологические факторы, определяющие биологическую вариацию результатов лабораторных исследований в пределах нормальных величин; 2) диагностические и лечебные мероприятия, проводимые обследуемому и определяющие ятрогенную вариацию; 3) условия взятия, хранения и транспортировки биологической пробы (доаналитическая вариация); 4) условия лабораторного анализа (измерения) — аналитическая вариация; 5) патологические факторы, определяющие отклонения результатов лабораторных исследований за пределы к нормальным величинам, т. е. патологическую вариацию (схема 2).

Результаты лабораторных исследований как случайные величины образуют вариационный ряд с характерным для него расположением большинства величин вблизи его центральной части и рассеиванием к краям ряда, создавая определенное распределение.

Пример. Из 10 определений глюкозы ($n = 10$) получены следующие значения: 480, 390, 470, 500, 480, 500, 490, 510, 410, 500 мг/л. В данном примере вероятность получения результата 500 мг/л больше, чем 510 мг/л, поскольку первая величина встречается 3 раза из 10 случаев (вероятность равна 0,3), а величина 510 — только 1 раз (вероятность равна 0,1). Отношение числа результатов, которые имеют определенные значения ($ш$) к общему числу возможных результатов (n) есть мера этой вероятности: $P = ш/n$. Вероятности значений в большинстве случаев не одинаковы, но сумма вероятностей всех возможных значений случайной величины всегда равна 1. По мере приближения величины P (вероятности) к единице достоверность получения того или иного результата возрастает. Закон распределения результатов характеризует связь между значениями случайной величины и вероятностями этих значений, т. е. совокупность значений x и вероятностей P . Если вероятности появления отдельных значений x выражаются величинами, соответствующими коэффициентам разложения бинома Ньютона, то распределение называется биноминальным. Распределение Пуассона представляет собой предельный случай биноминального распределения, в котором вероятность появления события очень редка. В биологии пуассонову распределению удовлетворяют редко наблюдаемые явления, например распределение островков Лангерганса в поджелудочной железе.

Каждый результат характеризуется определенным значением t . Найдя значение t по формуле для любого результата, можно найти его положение в вариационном ряду.

Закономерности нормального распределения дают возможность по двум параметрам (x и S) построить весь вариационный ряд. Отклонения от средней охватывают приблизительно шесть средних квадратических отклонений ($\pm 3S$).

Преимущество нормального распределения состоит в том, что оно предусматривает в интервалах $x \pm S$ всегда определенный процент значений. Так, 68,3% результатов лежит в пределах $x \pm 1S$, 95,5% — в пределах $x \pm 2S$ и 99,7% — в пределах $x \pm 3S$. Отсюда вероятность того, что взятый результат в вариационном ряду будет расположен в пределах $\pm 1S$, равна 0,683, в пределах $\pm 2S$ — 0,955 и в пределах $\pm 3S$ — 0,997.

Для биологических исследований, в том числе и для клинической лабораторной диагностики, существенны две вероятности — 0,95 и 0,99. Они получили название доверительных вероятностей, т. е. таких, значениям которых можно доверять и уверенно ими пользоваться. С вероятностью 0,95 любой результат будет отклоняться от x не более $1,96S$ и с вероятностью 0,99 — не более $2,58S$ (величину t находят по таблицам в руководствах по статистике).

Определенным значениям вероятностей соответствуют так называемые уровни значимости. Вероятности 0,95 (95%) соответствует уровень значимости 0,05 (5%), а вероятности 0,99 (99%) — уровень значимости 0,01 (1%). С помощью уровня значимости можно установить, в каком проценте случаев возможна ошибка в результатах. Например, 5% уровень значимости указывает, что в силу случайности возможна ошибка в 5% случаев наблюдения. Выбор уровня вероятности зависит от поставленных целей. В

клинической лабораторной диагностике при статистической обработке результатов в большинстве случаев можно остановиться на более низком уровне вероятности — 0,95 и соответственно на уровне значимости — 0,05.

В некоторых случаях оказывается, что по нормальному закону распределена не сама случайная величина, а ее логарифм. Поэтому все результаты сначала подвергают логарифмическому превращению, что приводит в ряде случаев к совпадению с нормальным распределением. Статистические преобразования проводят с логарифмами чисел, а затем производят обратную трансформацию данных.

Оценить распределение результатов можно с помощью графического построения и применения математических формул. При графическом построении кривой распределения результаты заносят сначала в таблицу с указанием их значений и частоты. По полученным данным строят график, на оси абсцисс откладывают результаты, на оси ординат — частоты.

Определить нормальное распределение можно также с помощью специальной «графической» бумаги, на ось ординат которой наносят частоту в процентах, а на ось абсцисс — результаты. Бумага размечена таким образом, что график нормального распределения всегда представлен прямой линией.

Кроме графического построения, существуют статистические тесты, позволяющие определить соответствие фактического распределения полученных результатов теоретическому распределению.

Лабораторные результаты обычно подчиняются закону нормального распределения при многократном повторном исследовании, когда имеют место в основном аналитические факторы вариации.

Биологические данные, т. е. признаки в популяции здоровых и больных, испытывающие влияние Биологических факторов вариации, могут не подчиняться закону нормального распределения. В таком случае для статистической обработки результатов может быть использовано их преобразование в логарифмы. Однако не всегда даже в гомогенной популяции распределение показателей различных веществ может соответствовать нормальному или логарифмическому нормальному распределению. Вид распределения результатов сам по себе может характеризовать многие биологические показатели, отражая специфику процесса, происходящего в организме, но для этого должна быть использована репрезентативная выборка, т. е. количество исследований должно быть достаточным, чтобы судить о закономерностях биологического процесса в целом.

Кроме того, оценка вида распределения результатов имеет значение для правильного выбора статистических методов. При нормальном распределении результатов для их статистической обработки могут применяться параметрические критерии статистики, например тест Стьюдента для оценки достоверности различий или среднее квадратическое отклонение при оценке разброса результатов.

Если распределение не является нормальным или вид распределения определить невозможно из-за малого числа наблюдений ($n < 20$), то рекомендуется применять непараметрические критерии статистики, например тест Вилкоксона для оценки достоверности различий или метод оценки процентных уровней (процентилей) для выведения референтных величин.

2. Теоретические основы определения допустимых погрешностей лабораторных методов исследования

Определение допустимых пределов погрешности результатов лабораторных исследований преследует цель установить приемлемость их аналитических качеств для клинических целей.

Теоретические основы определения допустимой аналитической вариации (случайной погрешности) базируются на следующем:

Определение аналитической вариации (среднего квадратического отклонения и

коэффициента вариации) в наиболее квалифицированных лабораториях. Полезными в этом вопросе могут быть опыты по межлабораторному контролю качества, позволяющие определить межлабораторную вариацию.

Теоретический расчет аналитической вариации как фиксированной части биологической вариации. Для улучшения диагностической значимости лабораторных тестов наиболее существенна не абсолютная величина аналитической вариации, а ее соотношение с биологической вариацией.

Соотношение между различными видами вариации определяется следующим уравнением: $S2\text{оби}u = S2\text{aH} + S2\text{бон}$ где $S2\text{общ}$ — общая вариация; $S2\text{aH}$ — аналитическая вариация; $S2\text{биол}$ — биологическая вариация.

Аналитическая вариация, равная 1/4 пределов нормальных величин в процентах от средней величины нормы, расширяет их более чем на 20%, равная 1/8 — на 10—12%. равная 1/12 — менее чем на 8%.

Коэффициент вариации метода не должен превышать 1/8 области нормальных пределов в процентах от средней величины нормы; при этом нормальные величины рассматриваются как совокупность аналитической и биологической вариаций.

Во всех случаях при расчете допустимых пределов погрешности метода индивидуально для каждого вещества и метода аналитическая вариация, полученная экспериментально, должна сопоставляться с теоретически рассчитанными величинами. Медицински допустимые пределы погрешности. Этот способ оценки допустимых пределов погрешности основан на опросе мнений врачей-клиницистов и лабораторных работников.

Каждое вещество в конечном счете исследуется для определенных клинических целей — установления диагноза, контроля за лечением, обследования здоровых лиц, поэтому медицински допустимые пределы погрешности в различных клинических ситуациях будут различными. Например, при повторном анализе теста медицински допустимые пределы погрешности будут включать внутрииндивидуальную и аналитическую вариации изо дня в день. При массовом обследовании здоровых наибольшее значение для разделения нормы и патологии будут иметь межиндивидуальные колебания. В такой ситуации требования к точности будут ниже.

Технология оценки результатов лабораторных исследований

Результаты лабораторных исследований (информация) — единственный продукт, производимый лабораторией. При интерпретации результатов анализов необходимо оценить, значимы ли обнаруженные отклонения величин исследуемых параметров от нормальных показателей (референтных величин); имеют ли эти отклонения физиологический характер или они являются патологическими (то есть нет ли оснований объяснить их какими-либо физиологическими или иными, не связанными с болезнью причинами); насколько надёжно эти отклонения или их сочетание позволяют подтвердить диагноз определённой болезни.

Понятие референтной величины.

Важнейший этап оценки результатов лабораторных исследований — установление отличия нормы от патологии. Это нетрудно сделать при явном отклонении показателей от нормы. Однако большинство результатов лабораторных анализов непросто разделить на «норму» и «патологию», поскольку они по природе своей не дихотомические и не имеют отчётливых разрывов или двух различных пиков, из которых один соответствовал бы нормальному результату, а другой — патологическому. Объясняется это несколькими причинами.

Во-первых, разделение биологической популяции людей по многим лабораторным показателям на больных и здоровых невозможно даже с теоретической точки зрения. Заболевание может развиваться незаметно, проявляясь постепенным переходом от небольших отклонений показателя к высоким по мере нарастания дисфункции.

Во-вторых, здоровые и больные фактически принадлежат к двум различным

популяциям, но когда эти две популяции перемешаны, распознать каждую из них в общей массе практически невозможно, поскольку у различных больных один и тот же показатель может принимать различные значения, перекрывая значения этого показателя у здоровых; кроме того, количество больных в общей популяции невелико.

Чтобы трактовать данные лабораторных исследований, необходимо сравнивать их с нормальными величинами, поэтому важно определить, что такое нормальный показатель. Нормальные показатели — показатели, выявляемые у здоровых людей, однако в группах последних они могут иметь различные числовые значения. Это обусловлено индивидуальными особенностями обмена веществ, гемопоэз функционирования тех или иных органов. Нормальные лабораторные показатели определяют путём выборочного обследования здоровой популяции людей, например, специально отобранных призывающих или студентов, группируемых по возрасту и полу. При проведении исследований некоторые факторы должны быть стандартизованы. Например, при исследовании крови её необходимо забирать натощак, способ забора у всех обследуемых должен быть одинаковым, так же как и метод определения исследуемых показателей. Математический анализ результатов, полученных при таких исследованиях, позволил выделить два основных класса параметров биоматериалов здоровых людей. Одни из них подчиняются закону Гаусса (нормального) распределения, другие — биноминальному распределению.

Например, всем обследуемым определяют концентрацию глюкозы в крови и строят

$$X_{cp} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{cp})^2}{n-1}}$$

кривую распределения. Среднюю величину рассчитывают делением суммы всех результатов на их количество. где: X_{cp} — средняя величина; n — количество результатов, X_i — значение отдельного результата? Дисперсию средней величины при распределении Гаусса можно выразить среднеквадратическое — отклонением (SD), которое рассчитывают с помощью следующей формулы.

Как правило, распределение биологических объектов по степени выраженности одного из признаков описывает кривая Гаусса (рис. 1-1), это подразумевает, что в интервал, где величина признака колеблется в пределах $M \pm 2SD$ (применительно к концентрации глюкозы в крови — 3,9-6,38 ммоль/л) попадает более 95% биологических объектов; тем не менее почти у 5% лиц здоровой популяции концентрация глюкозы не входит в интервал $M \pm 2SD$. Именно поэтому критерием диагностики сахарного диабета считают концентрацию глюкозы в крови 7 ммоль/л и выше, а пациентов с результатами в пределах 6,38-6,9 ммоль/л относят к группе риска по данному заболеванию.

Таким образом, если распределение признака отвечает закону Гаусса, то нормальные лабораторные показатели определяют как среднее значение показателя для здоровой популяции ± 2 стандартных отклонения ($\pm 2SD$).

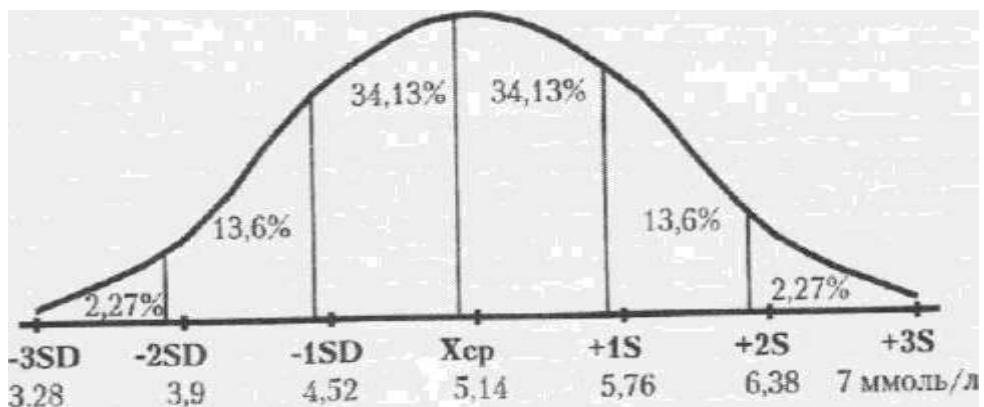


Рис. 1-1. Гауссово распределение (на примере концентрации глюкозы в крови у здоровых лиц).

Вместе с тем у 5% здоровых людей значение показателя выходит за пределы указанного диапазона. Приведённой математической закономерности подчиняется распределение значительной части лабораторных показателей химического и клеточного состава крови.

Ко второй группе лабораторных показателей относят результаты, для которых расчёт средней величины и среднеквадратичного отклонения невозможны. Поэтому для таких показателей вместо наиболее частой нормальной величины определяют и указывают пределы нормальных колебаний. Можно просто указать диапазон полученных результатов от самой малой до самой большой величины, но чаще отсекают 3% первых величин (снизу) и 3% последних (сверху).

Вместе с тем нормальные лабораторные показатели различных веществ, которыми нередко пользуются в лабораторной диагностике, включают только общую биологическую вариацию без учёта отдельных факторов, что снижает диагностическую ценность лабораторных тестов. Поэтому на смену термину «нормальные лабораторные показатели» приходит концепция референтных величин. Референтные величины дают представление о диапазоне, в котором располагаются нормальные величины. Смысл этого введения состоит в том, что результаты лабораторного исследования сравнивают с референтными величинами, полученными в чётко определённых условиях с учётом отдельных факторов, влияющих на биологическую вариацию. Референтные величины в настоящее время установлены для ограниченного количества показателей (приблизительно 150). Установление референтных интервалов колебаний для каждого лабораторного параметра имеет существенное значение для всей проблемы надёжности лабораторной информации, так как сравнение с ними служит 'нованием для принятия диагностических и лечебных решений.

При оценке результатов лабораторных исследований необходимо помнить, что референтные величины являются статистическими данными 95% популяции, и отклонения за пределы диапазона не обязательно указывают на наличие патологии.

Как правило, стандартный набор биохимических исследований, применяемых в обычных лечебных учреждениях, включает не менее 10-12 тестов. Вероятность того, что результаты всех 12 тестов окажутся нормальными, невелика. При статистическом анализе установлено, что при определении 8 показателей результат одного из них будет «патологическим» приблизительно у 25% здоровых лиц, а при проведении 20 тестов одно или более отклонений от нормы выявят у 55%. Приведённые данные подтверждают мысль о том, что каждое лабораторное исследование следует назначать обдуманно, по строгим показаниям, а перечень скрининговых тестов должен быть ограниченным.

Таким образом, приблизительно у 5% здоровых людей выявляют «ненормальные» лабораторные показатели, поэтому не все значения, выходящие за пределы нормы, следует расценивать как патологические. И напротив, не всегда показатель, лежащий в

интервале $M \pm 2SD$, следует считать нормальным, так как диапазон многих параметров достаточно широк. Например, в норме гематокрит у мужчин варьирует от 42 до 52%. Массивная кровопотеря может привести к падению гематокрита от 52 до 42%. Показатель 42% не вызовет тревоги у врачей, поскольку он относится к диапазону нормальных величин, хотя для конкретного пациента такое снижение может быть клинически значимым. Поэтому каждый врач должен помнить об изменчивости нормы, связанной с внутрииндивидуальными и межиндивидуальными вариациями. По этой же причине лучшими референтными величинами для конкретного пациента следует считать стабильные результаты лабораторных исследований, полученные при его обследовании в течение нескольких лет.

2.2 Лабораторная работа № 2 (2 часа).

Тема: *Определение показателей общеклинического анализа крови: гемоглобин, количество эритроцитов, гематокрит.*

2.2.1 Цель работы:

1. Ознакомиться с техникой взятия крови для общего анализа
2. Овладеть методами исследования красной крови.

2.2.2 Задачи работы:

1. Изучить порядок взятия крови.
2. Определить уровень гемоглобина, количество эритроцитов и гематокрит.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. 0,1N р-ра соляной кислоты.
2. Гемометра Сали.
3. 0,9 % р-р хлорида натрия.
4. Камера Горяева.
5. Гематокритные капилляры.
6. Центрифуга.

2.2.4 Описание (ход) работы:

Гемоглобин, эритроциты и цветной показатель отражают состояние красной крови. Диагностическое значение исследования заключается в выявлении больных с анемиями, дифференциации и контроле за лечением анемий.

Взятие крови на гемоглобин.

Нормы для взрослого здорового человека: для женщин 120-140 г/л, для мужчин 130-160 г/л. Экспресс - метод определения гемоглобина (по методу Сали).

Гемоглобин определяется визуальным колориметрическим методом в гемометре Сали. В пробирку гемометра Сали набирают 0,1н р-ра соляной кислоты до метки 2г%. Пипеткой Сали набирают 0,02мл крови до метки и вносят в пробирку с соляной кислотой. Образуется раствор солянокислого гематина.

Через 5 минут эту жидкость разводят дистиллированной водой до тех пор, пока цвет её не сравняется со стандартными растворами гемометра Сали. При разведении для перемешивания используют стеклянную палочку.

Результат отмечают в г %, а затем переводят в г/л.

Подсчет эритроцитов.

Эритроциты - это красные кровяные тельца, их диаметр составляет 7,5 - 8,3 мкм. Нормальные показатели эритроцитов в крови составляют для мужчин $4,0 - 5,1 \times 10^{12}/\text{л}$, у женщин - $3,7 - 4,7 \times 10^{12}/\text{л}$.

Для подсчета эритроцитов кровь разводят в 200 раз. В сухую пробирку отмеривают

4 мл разводящей жидкости - 0,9% р-ра хлорида натрия. Пипеткой Сали набирают 0,02 мл крови. Обтирают носик пипетки сухой ваткой и вносят кровь на дно пробирки с разводящей жидкостью, затем пипетку Сали промывают в верхнем слое жидкости (3 раза). Содержимое пробирки перемешивают и оставляют стоять в штативе до момента счета.

Рекомендуется считать эритроциты в ближайшие 2-3 часа после взятия крови, а при анемиях - сразу после взятия, так как эритроциты могут разрушиться.

Подсчет эритроцитов в 1 литре крови производят в счетной камере Горяева. Подсчет производят в 5 больших квадратах, разделенных на 16 маленьких по диагонали сетки камера Горяева (80 малых квадратов). Объем 1 малого квадрата составляет 1/4000 мкл. Разведение крови составляет 200 раз (4 мл 0,9% р-ра хлорида натрия и 0,02 мл крови), площадь сетки камеры Горяева 9 мм², глубина камеры 0,1 мм.

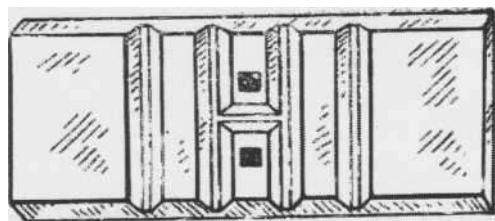
Расчет количества эритроцитов в 1 литре крови производят, исходя из разведения крови, числа сосчитанных квадратов, объема 1 малого квадрата по формуле:

$$\text{Эритроциты} = X \times 4000 \times 200 \times 10^6 / 80$$

где: X - это количество эритроцитов сосчитанных в камере Горяева.

Сокращенная формула подсчета эритроцитов в 1 литре крови:

$$\text{Эритроциты} = X \times 10\,000 \times 10^6 / \text{л}$$



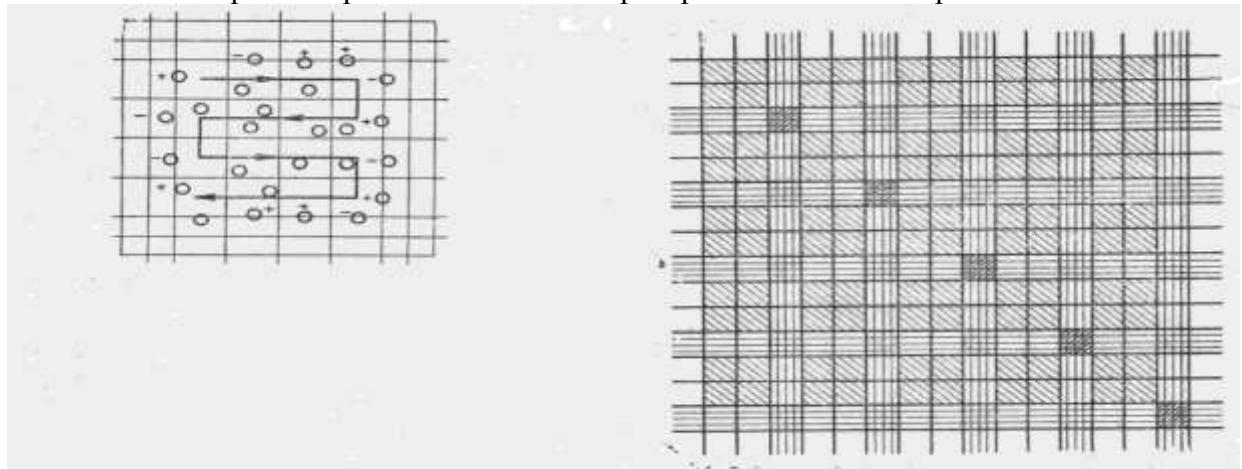
покровного стекла. Камера заполняется по принципу капиллярности. Кровь должна заполнить равномерно все

Камера Горяева имеет 2 сетки, и это позволяет одновременно произвести подсчет и эритроцитов и лейкоцитов. Камера изготовлена из толстого стекла, имеет глубину 0,1мм и площадь сетки камеры - 9 мм².

Подготовка счетной камеры Горяева
Протереть корпус камеры с сеткой и покровное стекло насухо

Протереть покровное стекло к поверхности камеры Горяева до появления «радужных колец» (кольцо Ньютона)

Пипеткой отобрать каплю разведенной крови из пробирки, предварительно перемешав содержимое и поднести пипетку к краю камеры с сеткой.



Устройство сетки камеры Горяева

Правила подсчета форменных элементов в сетке камеры Горяева.

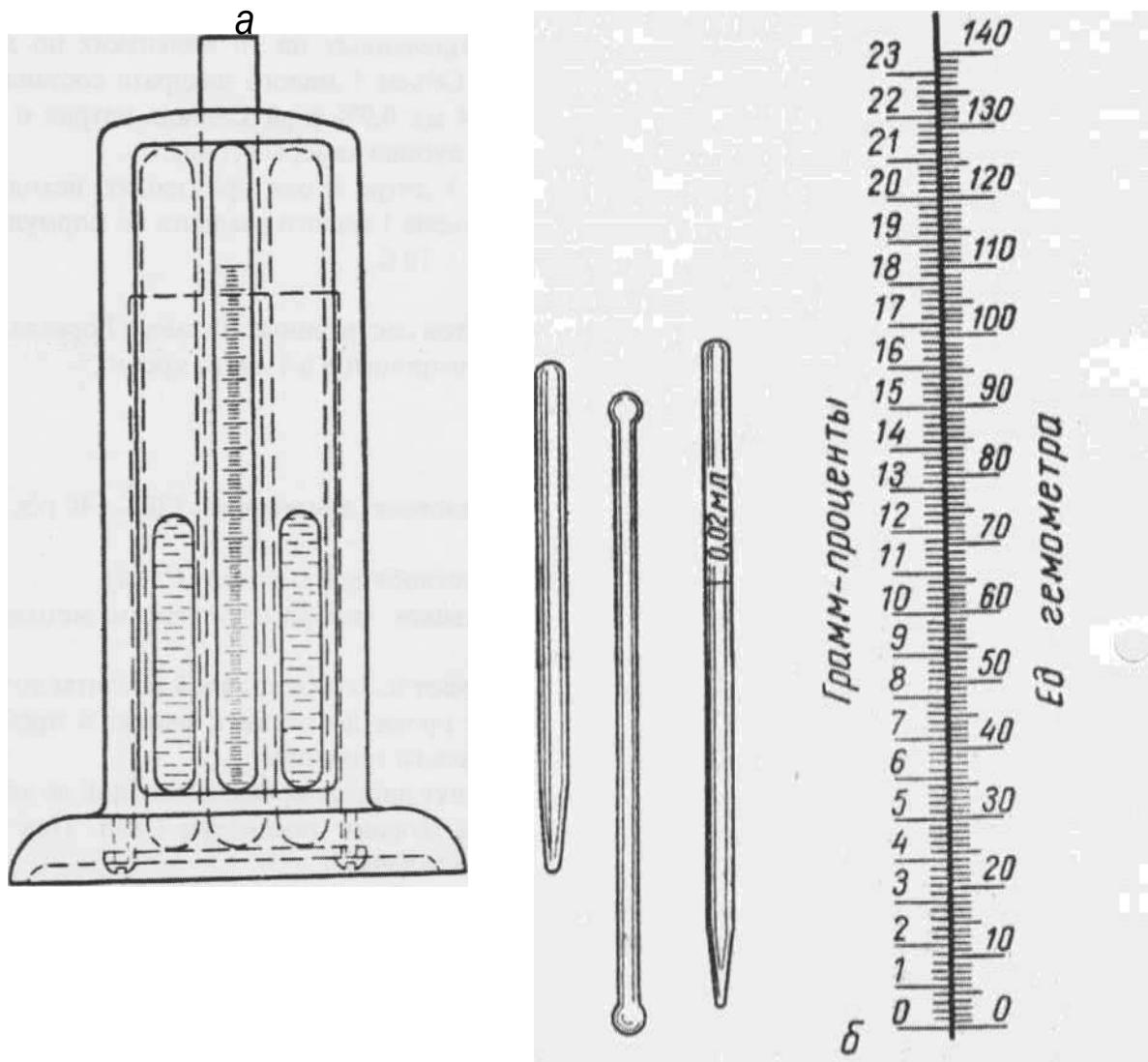
Камеру оставляют на 1-2 минуты для оседания форменных элементов, и затем производят подсчет с помощью микроскопа при малом увеличении (объектив x 8, окуляр x 10), конденсор опущен, диафрагма закрыта).

Источники ошибок при подсчете форменных элементов крови.

Образование сгустка. Взятие крови следует производить быстро и ловко, т.к. образование сгустка приводит к снижению количества форменных элементов.

Образование пузырька воздуха в счетной камере Горяева

Неправильное притирание покровного стекла искажает объем камеры и,



следовательно, результат исследования.

К подсчету форменных элементов приступают через 1-2 минут после заполнения камеры. Недоброкачественность разводящей жидкости может привести к разрушению клеток. Недостаточное количество подсчитанных квадратов, нарушение техники подсчета в квадрате.

Устройство гемометра Сали (ГС - 3).

А - гемометр с принадлежностями, б - шкала градуированной пробирки.

Гематокрит - это отношение суммарного объема форменных элементов крови к общему объему крови. Изменение уровня гематокрита крови может свидетельствовать о наличии таких патологических состояний, как эритроцитозы, лейкозы, дегидратация (повышение гематокрита), анемии, гипергидратация (снижение гематокрита). Особенно важным является необходимость контроля уровня гематокрита при проведении процедур гемодиализа.

Метод центрифугирования. Данный метод основан на разделении плазмы и форменных элементов посредством центрифугирования. Определение производят в

гематокритных капиллярах, представляющих собой стеклянную трубку, разделенную шкалой на 100 равных частей. Процесс центрифугирования занимает продолжительное время (10-30 минут). Гематокрит определяется по числу делений в трубке, занимаемых форменными элементами. Гематокрит - величина, определяющая общий объем эритроцитов. Нормальные показатели: мужчины - 40 - 48%, женщины - 36 - 42%.

Клиническое значение: при эритремиях - выше нормы, при анемиях - ниже нормы.

Ретикулоциты. В норме содержание ретикулоцитов в крови составляет 0,2 - 1,2% (на 100 эритроцитов). Определение количества ретикулоцитов играет важную роль для диагностики анемий: уменьшение количества ретикулоцитов наблюдается при злокачественном малокровии, лучевых поражениях, лейкозах, т.е. свидетельствует об ослаблении функции костного мозга и плохой регенерации красной крови.

Увеличение количества ретикулоцитов - ретикулоцитоз - наблюдается после кровопотери, при гемолитической анемии, в период криза, на фоне лечения В 12-дефицитной анемии.

2.3 Лабораторная работа № 3 (2 часа).

Тема: *Определение расчетных показателей общеклинического анализа крови: цветной показатель, кривая Прайс-Джонса, среднее содержание гемоглобина в одном эритроците.*

2.3.1 Цель работы:

1. Ознакомиться с методиками определения расчетных показателей общеклинического анализа крови.
2. Овладеть методами расчета цветного показателя, кривую Прайс-Джонса, среднее содержание гемоглобина в одном эритроците.

2.3.2 Задачи работы:

1. Изучить методики определения расчетных показателей общеклинического анализа крови.
2. Определить цветной показатель, кривую Прайс-Джонса, среднее содержание гемоглобина в одном эритроците.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Лабораторные показатели красной крови пациента.
2. Калькулятор.
3. Линейка, карандаш.

2.3.4 Описание (ход) работы:

Определение цветного показателя (ЦП) указывает на степень насыщения эритроцитов гемоглобином. ЦП отражает соотношение между концентрацией гемоглобина и числом эритроцитов в 1 литре крови.

Расчет ЦП производят по формуле: ЦП = Нв (г/л) x 3

3 первые цифры эритроцитов

В норме цветной показатель составляет 0,85 - 1,05.

Эти цифры свидетельствуют о нормальном насыщении гемоглобином эритроцитов.

В окрашенном мазке крови такие эритроциты имеют розовый цвет и называются нормохромными. При различного вида анемиях эритроциты могут содержать недостаточное количество гемоглобина или наоборот, могут быть перенасыщены им.

Гипохромия - ЦП меньше 0,8 - эритроциты бледные

Гиперхромия - ЦП больше 1,1 - эритроциты пересыщены гемоглобином, они более темные, чем нормальные

Цветной показатель служит для дифференциации анемий:

ЦП ниже 0,8 - анемии гипохромные, развивающиеся при недостатке железа в организме, хронических кровопотерях, после инфекций, интоксикаций, злокачественных новообразованиях

Анемии с ЦП выше 1,1 - гиперхромные - В 12-дефицитная анемия, при злокачественных новообразованиях.

Нормохромные анемии - с ЦП 0,85 - 1,1 развиваются при гемолитических, апластических анемиях.

Размеры эритроцита весьма изменчивы, но в большинстве случаев их диаметр равен 7—7,7 мкм, толщина 2 мкм, объем 76—100 мкм, площадь поверхности 140—150 мкм².

В зависимости от диаметра выделяют следующие эритроциты:

- 6-9 мкм – нормоциты
- менее 6 мкм - микроцитами
- более 9 мкм – макроцитами
- более 12 мкм – мегалоциты.

Распределение эритроцитов по диаметру называется кривой Прайс-Джонса.



У здоровых людей кривая Прайс-Джонса носит характер нормального распределения. Увеличение числа малых эритроцитов называется микроцитозом, увеличение числа больших эритроцитов – макроцитозом, значительная вариабельность размеров – аизоцитозом.



1 – микроцитоз, 2- макроцитоз, 3 –мегалоцитоз при пернициозной анемии, 4 – аизоцитоз на фоне (жёлтой) нормальной кривой Прайс-Джонса.

Любое изменение концентрации микроэлементов, гормонов или витаминов ведет к нарушению синтеза гемоглобина и развитию анемии. Заподозрить развивающуюся

патологию и ее причину позволяет среднее содержание hb в эритроците мсн (mean corpuscular hemoglobin). Величина МСН идентична цветовому показателю крови (ЦП), который раньше рассчитывался вручную. Среднее содержание гемоглобина в эритроците повышенено в двух случаях: если усиливается синтез гемоглобина или снижается размер красных кровяных телец. Если высокое МСН сочетается с низким содержанием гемоглобина в целом, то такое состояние называют гиперхромной анемией.

Развивается она в результате:

- хронической кровопотери (желудочно-кишечные кровотечения, геморрой, обильные месячные у женщин);
- недостатка витамина В12 и фолиевой кислоты (нередко он возникает на фоне хронического гастрита);
- повышенного разрушения эритроцитов в кровяном русле (при отравлении гемолитическими ядами);
- гипотиреоза – недостаточной выработки гормонов щитовидной железы;
- заболеваний печени;
- увеличения селезенки;
- нарушения роста эритроцитов;
- метастазирования злокачественных опухолей;
- приема лекарственных препаратов (цитостатиков, оральных гормональных контрацептивов, противосудорожных средств).

Среднее содержание hb в эритроците понижено, если значение МСН менее 27 пг. Подобное состояние развивается при нарушении процесса синтеза гемоглобина в костном мозге. В итоге красные кровяные тельца заполнены им частично и плохо справляются с функцией переноса газов. Такая анемия называется гипохромной, характеризуется она бледностью кожи и слизистых, повышенной утомляемостью, одышкой.

Среднее содержание гемоглобина в эритроците понижено в следующих случаях:

- острая потеря крови;
- свинцовая интоксикация;
- хронические болезни почек;
- беременность;
- недостаток железа в организме;
- талассемии – врожденного дефекта белковой части гемоглобина;
- порфирии – нарушения пигментного обмена в печени и костном мозге.

Такой небольшой показатель, как среднее содержание гемоглобина в эритроците дает обширную информацию доктору для диагностического поиска. Стойкое его снижение позволяет заподозрить многие наследственные болезни или влияние на здоровье факторов окружающей среды. Повышение МСН в совокупности с клинической картиной позволяет отличить злокачественную анемию (развивающуюся в результате недостатка витамина В12 и фолиевой кислоты) от хронической кровопотери. Подобные моменты крайне важны для дальнейшего лечения пациента. Несмотря на то, что все анемии ведут к ухудшению газообмена и выраженной слабости, лечение их существенно различается. Например, железодефицитную анемию лечат препаратами железа, которые не дадут никакого эффекта при анемии гемолитического характера или гипотиреозе.



Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC)

Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC) вычисляется путем деления концентрации гемоглобина в г/100 мл на гематокрит и умножения на 100:

$$\circ \quad MCHC = \frac{\text{Гемоглобин (г/дл)}}{100} \times \frac{100}{\text{Гематокрит (\%)}}$$

MCHC отражает насыщение эритроцита гемоглобином и в **норме составляет 30-38 г/дл.**

- \circ В отличие от MCH MCHC не зависит от клеточного объема и является чувствительным тестом при нарушениях процессов гемоглобинообразования. Предельная концентрация гемоглобина (38 г/дл) встречается редко.

2.4 Лабораторная работа № 4 (2 часа).

Тема: Приготовление мазка крови для определения лейкограммы, её оценка.

2.4.1 Цель работы:

1. Ознакомиться с методикой приготовления мазка крови для определения лейкограммы.
2. Овладеть методикой подсчета лейкограммы.

2.4.2 Задачи работы:

1. Изучить методику приготовления мазка крови для определения лейкограммы.
2. Провести подсчет лейкограммы и ее оценку.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Предметное стекло.
2. Шлифованное стекло.
3. Микроскоп.
4. Иммерсионное масло.

2.4.4 Описание (ход) работы:

Мазки крови делаются на чистых обезжиренных стеклах. Для приготовления используют шлифованное стекло, край которого должен быть уже, чем ширина предметного стекла, на котором готовят мазок. Предметное стекло захватывают за длинные ребра большим и указательным пальцем правой руки. Стерильным предметным стеклом прикасаются к куполу капли крови на расстоянии 1-1,5 мм от края стекла (не следует прикасаться стеклом к коже пальца). Затем стекло размещают на поверхности стола, так чтобы капля крови располагалась сверху и справа. Шлифованное стекло располагают слева от капли под углом 45 градусов, затем продвигают вправо до соприкосновения с каплей крови. Ждут, пока кровь распределится вдоль шлифованного стекла. Затем быстро, спокойно, не надавливая на предметное стекло, продвигают шлифованное стекло справа налево до тех пор, пока капля крови не будет исчерпана. Требования к мазку крови – он должен быть равномерной толщины, желтоватого цвета. Должен заканчиваться «метелочкой, щеточкой», т.е. неровно. Вся капля крови должна быть использована для мазка. Мазок должен занимать 3/4 стекла. Мазок должен быть полупрозрачен. Хороший мазок должен иметь бархатистую поверхность.

Толстый, красный мазок непригоден для использования, т.к. форменные элементы в нем располагаются неравномерно и деформируются. В слишком тонком мазке трудно сосчитать необходимое количество лейкоцитов. Полученный мазок подсушивают на воздухе, и затем подписывают с толстого края инициалы больного и регистрационный

номер. Для анализа делают не менее 2-х мазков. Лейкоцитарная формула (лейкограмма) - это процентное соотношение различных форм лейкоцитов, подсчитанных в окрашенном мазке крови. Нормальные показатели лейкоцитарной формулы:

Нейтрофилы:

Палочкоядерные - 1 - 6 % Сегментоядерные - 45 - 70 %

Эозинофилы - 0-5%

Моноциты - 2-9%

Базофилы - 0-1 %

Лимфоциты - 18 - 40%

Мазки фиксируют и окрашивают по методу Романовского (смесью азурита и эозина) Подсчет лейкоцитарной формулы проводят в окрашенном мазке с использованием микроскопа при большом увеличении (окуляр x10 (x7), объектив x90, диафрагма открыта, конденсор поднят) с использованием иммерсионной системы

Чтобы подсчитать лейкоцитарную формулу в мазке крови подсчитывается не менее 100 клеток, если выявляется патологический процесс, то 200 - 400 клеток. Лейкоциты располагаются в мазке неравномерно: более легкие (лимфоциты) - в середине мазка, а более тяжелые (моноциты) - с краю.

Подсчет лейкоцитарной формулы начинают с тонкого края мазка, отступив 3-5 п/зр от края. Подсчитывают клетки от края до края поперек мазка, затем 5-6 п/зр по краю, и снова поперек и т.д. до 100 клеток.

Подсчет лейкоцитарной формулы осуществляется лаборантом с помощью просмотра крови под микроскопом (подсчет лейкограммы на сто клеток). Кроме этого, используют гематологический автоматический анализатор. При отклонениях от нормы дополнительно проводят микроскопическое исследование мазка, при этом описывают морфологию клеток и уточняют лейкограмму. Использование автоматической аппаратуры позволяет получить максимально точный результат: можно проанализировать более 2000 клеток, в то время как под микроскопом - максимум 200. При исследовании с помощью анализатора результат получается более объективным. Автоматический подсчет имеет и недостаток: невозможность разделить нейтрофилы на сегментоядерные и палочкоядерные. Но в случае большого количества молодых форм, аппаратура фиксирует сдвиг влево.

Варианты изменения (сдвига) лейкоцитарной формулы:

- Сдвиг лейкоцитарной формулы влево – увеличение количества незрелых (палочкоядерных) нейтрофилов в периферической крови, появление метамиелоцитов (юных), миелоцитов;

- Сдвиг лейкоцитарной формулы вправо – уменьшение нормального количества палочкоядерных нейтрофилов и увеличение числа сегментоядерных нейтрофилов с гиперсегментированными ядрами (мегалобластная анемия, болезни почек и печени, состояние после переливания крови).

Нейтрофильные лейкоциты (нейтрофилы). Наиболее многочисленная разновидность белых клеток крови, они составляют 45-70% всех лейкоцитов. В зависимости от степени зрелости и формы ядра в периферической крови выделяют палочкоядерные (более молодые) и сегментоядерные (зрелые) нейтрофилы. Более молодые клетки нейтрофильного ряда – юные (метамиелоциты), миелоциты, промиелоциты – появляются в периферической крови в случае патологии и являются свидетельством стимуляции образования клеток этого вида. Длительность циркуляции нейтрофилов в крови составляет в среднем примерно 6,5 часов, затем они мигрируют в ткани. Участвуют в уничтожении проникших в организм инфекционных агентов, тесно взаимодействуя с макрофагами (моноцитами), Т- и В-лимфоцитами. Нейтрофилы секретируют вещества, обладающие бактерицидными эффектами, способствуют регенерации тканей, удаляя из них поврежденные клетки и секреции стимулирующие регенерацию вещества. Основная их функция – защита от инфекций путем хемотаксиса

(направленного движения к стимулирующим агентам) и фагоцитоза (поглощения и переваривания) чужеродных микроорганизмов. Увеличение числа нейтрофилов (нейтрофилез, нейтрофиля, нейтроцитоз), как правило, сочетается с увеличением общего числа лейкоцитов в крови. Резкое снижение количества нейтрофилов может привести к угрожающим жизни инфекционным осложнениям. Агранулоцитоз – резкое уменьшение числа гранулоцитов в периферической крови вплоть до полного их исчезновения, ведущее к снижению сопротивляемости организма к инфекции и развитию бактериальных осложнений.

Увеличение общего числа нейтрофилов:

- Острые бактериальные инфекции (абсцессы, остеомиелит, аппендицит, острый отит, пневмония, острый пиелонефрит, сальпингит, менингиты, ангина, острый холецистит, тромбофлебит, сепсис, перитонит, эмпиема плевры, скарлатина, холера и др.);
- Воспаление или некроз тканей (инфаркт миокарда, обширные ожоги, гангрена, быстро развивающаяся злокачественная опухоль с распадом, узелковый периартериит, острый ревматизм, ревматоидный артрит, панкреатит, дерматит, перитонит);
- Состояние после оперативного вмешательства;
- Миелопролиферативные заболевания (хронический миелолейкоз, эритремия);
- Острые геморрагии;
- Синдром Кушинга;
- Приём кортикоидов;
- Эндогенные интоксикации (уреmia, эклампсия, диабетический ацидоз, подагра);
- Экзогенные интоксикации (свинец, змеиный яд, вакцины);
- Выделение адреналина при стрессовых ситуациях, физическом напряжении и эмоциональных нагрузках (может привести к удвоению количества нейтрофилов в периферической крови).

Увеличение количества незрелых нейтрофилов (сдвиг влево):

- Острые воспалительные процессы (крупозная пневмония);
- Некоторые инфекционные заболевания (скарлатина, рожистое воспаление, дифтерия);
- Злокачественные опухоли (рак паренхимы почки, молочной и предстательной желез) и метастазирование в костный мозг;
- Миелопролиферативные заболевания, особенно хронический миелолейкоз;
- Туберкулэз;
- Инфаркт миокарда;
- Кровотечения;
- Гемолитический криз;
- Сепсис;
- Интоксикации;
- Шок;
- Физическое перенапряжение;
- Ацидоз и коматозные состояния.

Снижение числа нейтрофилов (нейтропения):

- Бактериальные инфекции (тиф, паратиф, туляремия, бруцеллез, подострый бактериальный эндокардит, милиарный туберкулэз);
- Вирусные инфекции (инфекционный гепатит, грипп, корь, краснуха, ветряная оспа);
- Малярия;
- Хронические воспалительные заболевания (особенно у пожилых и ослабленных людей);

- Почечная недостаточность;
- Тяжелые формы сепсиса с развитием септического шока;
- Гемобластозы (в результате гиперплазии опухолевых клеток и редукции нормального гемопоэза);
- Острый лейкоз, апластическая анемия;
- Аутоиммунные заболевания (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, хронический лимфолейкоз);
- Изоиммунный агранулоцитоз (у новорожденных, посттрансфузионный);
- Анафилактический шок;
- Сplenомегалия;
- Наследственные формы нейтропении (циклическая нейтропения, семейная доброкачественная хроническая нейтропения, постоянная наследственная нейтропения Костманна);
- Ионизирующая радиация;
- Токсические агенты (бензол, анилин и др.);
- Недостаточность витамина В12 и фолиевой кислоты;
- Приём некоторых медикаментов (производные пиразолона, нестероидные противовоспалительные препараты, антибиотики, особенно левомицетин, сульфаниламидные препараты, препараты золота);
- Прием противоопухолевых препаратов (цитостатики и иммунодепрессанты);
- Алиментарно-токсические факторы (употребление в пищу испорченных перезимовавших злаков и др.).

Эозинофилы. Эозинофилы участвуют в реакциях организма на паразитарные (гельминтные и протозойные), аллергические, инфекционные и онкологические заболевания, при включении в патогенез заболевания аллергического компонента, который сопровождается гиперпродукцией IgE. После созревания в костном мозге эозинофилы несколько часов (около 3-4 часов) находятся в циркулирующей крови, а затем мигрируют в ткани, где продолжительность их жизни составляет 8-12 дней. Для человека характерно накопление эозинофилов в тканях, контактирующих с внешней средой – в лёгких, желудочно-кишечном тракте, коже, урогенитальном тракте. Их количество в этих тканях в 100-300 раз превышает содержание в крови. При аллергических заболеваниях эозинофилы накапливаются в тканях, участвующих в аллергических реакциях, и нейтрализуют образующиеся в ходе этих реакций биологически активные вещества, тормозят секрецию гистамина тучными клетками и базофилами, обладают фагоцитарной и бактерицидной активностью. Для эозинофилов характерен суточный ритм колебания в крови, самые высокие показатели отмечаются ночью, самые низкие – днем. Эозинопения (снижение числа эозинофилов в крови) часто наблюдается в начале воспаления. Увеличение числа эозинофилов в крови (эозинофилия) соответствует началу выздоровления. Однако ряд инфекционных заболеваний с высоким уровнем IgE характеризуются высоким числом эозинофилов в крови после окончания воспалительного процесса, что указывает на незаконченность иммунной реакции с её аллергическим компонентом. Снижение числа эозинофилов в активной фазе заболевания или в послеоперационном периоде часто свидетельствует о тяжелом состоянии пациента.

- Увеличение числа эозинофилов (эозинофилия):
- Аллергические заболевания (бронхиальная астма, ангионевротический отек, эозинофильный гранулематозный васкулит, сенная лихорадка, аллергический дерматит, аллергический ринит);
 - Аллергические реакции на продукты питания, лекарственные препараты;
 - Паразитарные инвазии – глистные и протозойные (аскаридоз, токсокароз, трихинеллез, эхинококкоз, шистосомоз, филяриоз, описторхоз, лямблиоз и др.);
 - Фибропластический париетальный эндокардит;

- Гемобластозы (острые лейкозы, хронический миелолейкоз, эритремия, лимфомы, лимфогранулематоз) и другие опухоли, особенно с метастазами или некрозами;
- Синдром Вискотта-Олдрича
- Болезни соединительной ткани (ревматоидный артрит, узелковый периартериит);
- Заболевания легких;
- Некоторые детские инфекции (скарлатина, ветряная оспа).

Уменьшение числа эозинофилов и их отсутствие (эозинопения и анэозинофилия):

- Начальный период инфекционно-токсического (воспалительного) процесса;
- Повышение адренокортикоидной активности;
- Гнойно-септические процессы.

Базофилы. Наиболее малочисленная популяция лейкоцитов. Базофильные гранулоциты крови и тканей (к последним относятся и тучные клетки) выполняют множество функций: поддерживают кровоток в мелких сосудах, способствуют росту новых капилляров, обеспечивают миграцию других лейкоцитов в ткани. Участвуют в аллергических и клеточных воспалительных реакциях замедленного типа в коже и других тканях, вызывая гиперемию, формирование экссудата, повышенную проницаемость капилляров. Базофилы при дегрануляции (разрушении гранул) инициируют развитие анафилактической реакции гиперчувствительности немедленного типа. Содержат биологически активные вещества (гистамин; лейкотриены, вызывающие спазм гладкой мускулатуры; «фактор, активирующий тромбоциты» и др.). Продолжительность жизни базофилов 8-12 суток, время циркуляции в периферической крови (как и у всех гранулоцитов) – несколько часов.

Увеличение количества базофилов (базофилия):

- Аллергические реакции на пищу, лекарства, введение чужеродного белка;
- Хронический миелолейкоз, миелофиброз, эритремия, лимфогранулематоз;
- Гипофункция щитовидной железы (гипотиреоз);
- Нефрит;
- Хронический язвенный колит;
- Гемолитические анемии;
- Дефицит железа, после лечения железодефицитных анемий;
- В₁₂-дефицитная анемия;
- После спленэктомии;
- Лечение эстрогенами;
- Во время овуляции, беременности, в начале менструаций;
- Рак легких;
- Истинная полицитемия;
- Сахарный диабет;
- Острый гепатит с желтухой.

Моноциты – самые крупные клетки среди лейкоцитов (система фагоцитирующих макрофагов). Участвуют в формировании и регуляции иммунного ответа. Моноциты составляют 2-10% всех лейкоцитов, способны к амебовидному движению, проявляют выраженную фагоцитарную и бактерицидную активность. Макрофаги – моноциты способны поглотить до 100 микробов, в то время как нейтрофилы – лишь 20-30. В очаге воспаления макрофаги фагоцитируют микробы, денатурированный белок, комплексы антиген-антитело, а также погибшие лейкоциты, поврежденные клетки воспаленной ткани, очищая очаг воспаления и подготавливая его для регенерации. Секретируют более 100 биологически активных веществ. Стимулируют фактор, вызывающий некроз опухоли (кахексин), обладающий цитотоксическим и цитостатическим эффектами на опухолевые клетки. Секретируемые интерлейкин I и кахексин воздействуют на терморегуляторные центры гипоталамуса, повышая температуру тела. Макрофаги участвуют в регуляции кроветворения, иммунном ответе, гемостазе, метаболизме липидов и железа. Моноциты

образуются в костном мозге из моноblastов. После выхода из костного мозга циркулируют в крови от 36 до 104 часов, а затем мигрируют в ткани. В тканях моноциты дифференцируются в органо- и тканеспецифичные макрофаги. В тканях содержится в 25 раз больше моноцитов, чем в крови.

Увеличение числа моноцитов в крови (моноцитоз):

- Вирусные инфекции (инфекционный мононуклеоз);
- Грибковые, протозойные инфекции (малария, лейшманиоз);
- Период выздоровления после острых инфекций;
- Гранулематозы (туберкулез, сифилис, бруцеллез, саркоидоз, язвенный колит);
- Коллагенозы (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, узелковый периартериит);
- Болезни крови (острый моноblastный и миеломоноblastный лейкозы, хронические моноцитарный, миеломоноцитарный и миелолейкоз, лимфогрануломатоз);
- Подострый септический эндокардит;
- Энтерит;
- Вялотекущий сепсис.

Уменьшение числа моноцитов в крови:

- Гипоплазия кроветворения;
- Роды;
- Оперативные вмешательства;
- Шоковые состояния.

Лимфоциты являются главными клеточными элементами иммунной системы; образуются в костном мозге, активно функционируют в лимфоидной ткани. Главная функция лимфоцитов состоит в узнавании чужеродного антигена и участии в адекватном иммунологическом ответе организма. Лимфоциты представляют собой уникальную по разнообразию популяцию клеток, происходящих из различных предшественников и объединяемых единой морфологией. По происхождению лимфоциты подразделяются на две основные субпопуляции: Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Выделяется также группа лимфоцитов называемых «ни Т- ни В-», или «0-лимфоциты» (null lymphocytes). Клетки, входящие в состав указанной группы, по морфологической структуре идентичны лимфоцитам, но отличаются по происхождению и функциональным особенностям – клетки иммунологической памяти, клетки-киллеры, хелперы, супрессоры.

Разные субпопуляции лимфоцитов выполняют различные функции:

- обеспечение эффективного клеточного иммунитета (в том числе отторжение трансплантата, уничтожение опухолевых клеток);
- формирование гуморального ответа (синтез антител к чужеродным белкам - иммуноглобулинов разных классов);
- регуляция иммунного ответа и координации работы всей иммунной системы в целом (выделение белковых регуляторов – цитокинов);
- обеспечение иммунологической памяти (способности организма к ускоренному и усиленному иммунному ответу при повторной встрече с чужеродным агентом).

Следует иметь в виду, что лейкоцитарная формула отражает относительное (процентное) содержание лейкоцитов различных видов, и увеличение или снижение процентного содержания лимфоцитов может не отражать истинный (абсолютный) лимфоцитоз или лимфопению, а быть следствием снижения или повышения абсолютного числа лейкоцитов других видов (обычно нейтрофилов).

Увеличение количества лимфоцитов (лимфоцитоз):

- Вирусная инфекция (инфекционный мононуклеоз, острый вирусный гепатит, цитомегаловирусная инфекция, коклюш, ОРВИ, токсоплазмоз, герпес, краснуха);

- Заболевания лимфатической системы (острый и хронический лимфолейкоз, макроглобулинемия Вальденстрема);
 - Туберкулез;
 - Сифилис;
 - Бруцеллез;
 - Интоксикация (тетрахлорэтан, свинец, мышьяк).

Уменьшение количества лимфоцитов:

- Острые инфекции и заболевания;
- Начальная стадия инфекционно-токсического процесса;
- Тяжелые вирусные заболевания;
- Милиарный туберкулез;
- Прием кортикоидов;
- Злокачественные новообразования;
- Вторичные иммунные дефициты;
- Почечная недостаточность;
- Недостаточность кровообращения;
- Прием препаратов с цитостатическим действием.

2.5 Лабораторная работа № 5 (2 часа).

Тема: *Определение групп крови человека с помощью поликлонов А и В.*

2.5.1 Цель работы:

1. Ознакомиться с методикой определения групп крови человека.
2. Овладеть методикой определения групп крови человека с помощью поликлонов А и В.

2.5.2 Задачи работы:

1. Изучить методику определения групп крови человека.
2. Провести определение собственной группы крови с помощью поликлонов А и В.

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Реагенты поликлонов анти-А и анти-В.
2. Пипетки.
3. Планшет или тарелка.
4. Стеклянная палочка.

2.5.4 Описание (ход) работы:

Поликлоны анти-А и анти-В предназначены для определения групп крови человека системы АВО взамен стандартных изогем-агглютинирующих сывороток.

Определение групп крови системы АВО включает выявление антигенов А и В в эритроцитах стандартными антителами и выявление агглютининов в сыворотке или плазме исследуемой крови стандартными эритроцитами. Антигены А и В определяют с помощью поликлонов анти-А и анти-В. У доноров обязательно определение не только антигенов в эритроцитах, но и агглютининов в сыворотке (плазме) с помощью стандартных эритроцитов.

Основные свойства поликлональных сывороток.

Поликлоны анти-А и анти-В являются продуктом гибридомных клеточных линий, полученных в результате слияния мышиных антителообразующих В-лимфоцитов с

клетками мышиной миеломы. Индивидуальные гибридомные линии продуцируют гомогенные антитела только одного класса иммуноглобулинов, которые полностью идентичны по структуре и биологической активности. Антитела, продуцируемые клетками одного клона (потомство одной клетки), являются моноклональными.

Культура клеток одной специфичности, происходящих из одного лимфоцита, образует клетки одного клона. Главное заключается в следующем: необходимо получить от одной клетки специфические антитела и наработать их в неограниченном количестве. Трудность заключается в преодолении двух задач: во-первых, нормальные клетки после нескольких делений погибают; во-вторых, только раковые клетки способны неограниченно размножаться. Для решения этих двух несовместимых проблем в 1975 году Г. Кёлер и К. Мильштейн создали клеточные гибриды, или гибридомы. Гибридомы — это слияние нормальных лимфоцитов в питательной среде с клетками миеломы. Лимфоциты в этой среде не погибают, а от миеломного партнера получают возможность бесконечно размножаться. Таким образом, гибридомный клан размножается, а в результате этого процесса образуются моноклональные антитела.

Лимфоциты, несущие агглютиноген А, вырабатывают специфическое антитело анти-А; лимфоциты, несущие агглютиноген В, вырабатывают специфическое антитело анти-В. Моноклональные анти-А и анти-В антитела продуцируются двумя различными гибридомами. Поликлоны анти-А и анти-В представляют собой разведенную асцитную жидкость мышей-носителей соответствующей гибридомы, в которой содержатся специфические иммуноглобулины класса М (IgM), направленные против группоспецифических антигенов А или В человека.

Таким образом, поликлоны не содержат антител иной специфичности и поэтому не вызывают неспецифической полиагглютинации эритроцитов.

Авидность, то есть время наступления реакции агглютинации и ее выраженность, у целиклонов анти-А и анти-В выше, чем у изогемагглютинирующих АВО-сывороток, особенно, в случае слабо выраженных антигенов эритроцитов.

Поликлоны не являются клетками человеческих тканей, что исключает возможность инфекционного заражения.

Методика определения групп крови с помощью поликлонов анти-А и анти-В.

Определение групп крови системы АВО реагентами поликлон производится в нативной крови, стабилизированной с помощью применяемых консервантов (глюцинер, цитроглюкофосфат, гепарин и др.); в крови, взятой из пальца; в крови, взятой без консерванта. Наиболее четкая реакция агглютинации наблюдается при использовании высокой концентрации эритроцитов.

Определение группы крови производится в помещении с хорошим освещением при температуре от +15° до +25°С. Реагенты не должны храниться открытыми, так как при высыхании активность антител снижается. Не следует пользоваться реагентами, если в них имеются нерастворимые хлопья или помутнение. Для каждого реагента используют свою маркированную (анти-А или анти-В) пипетку. Определение группы крови системы АВО производится обычными методами на белой фарфоровой или любой другой планшетке со смачиваемой поверхностью.

Высокая активность и авидность реагентов поликлон позволяет применять по одной серии реагентов анти-А и анти-В. На плоскость планшета или тарелку наносят поликлоны анти-А и анти-В по две капли (0,1 мл) под соответствующими надписями: анти-А или анти-В. Рядом с каплями антител наносят исследуемую кровь по одной маленькой капле, приблизительно в 10 раз меньше (0,01 мл). В случае определения группы крови, взятой из пальца или взятой без консерванта, необходимо брать большое количество эритроцитов, т. е. первые капли из пальца (без сильного выдавливания) или свободные эритроциты из осадка свернувшейся крови.

При определении группы крови антитела и кровь смешивают стеклянной палочкой или углом предметного стекла, которые промывают и досуха вытирают перед

размешиванием каждой капли. Наблюдение за реакцией проводят при легком покачивании в течение не более 2,5 минуты. Положительный результат при определении группы крови проявляется себя агглютинацией (склеиванием) эритроцитов. При этом агглютинаты можно увидеть без каких-либо приспособлений в виде мелких красных агрегатов, быстро сливающихся и образующих крупные хлопья. При отрицательной реакции определения группы крови капля остается равномерно окрашенной в красный цвет, агглютинаты в ней не обнаруживаются. Агглютинация, обычно, определяется в течении первых 3—5 секунд. Несмотря на это, наблюдение за результатами необходимо вести не меньше 2,5 минуты из-за возможности более позднего наступления агглютинации с эритроцитами, содержащими слабые разновидности антигенов А или В.

2.6 Лабораторная работа № 6 (2 часа).

Тема: *Определение резус-фактора в крови человека с помощью антирезусной сыворотки.*

Цель работы:

1. Ознакомиться с методикой определения резус-фактора крови человека.
2. Овладеть методикой определения резус-фактора крови человека.

2.6.2 Задачи работы:

1. Изучить методику определения резус-фактора крови человека.
2. Провести определение собственного резус-фактора крови.

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Поликлоны Анти-D, Анти-C, Анти-c
2. Пипетки.
3. Планшет или тарелка.
4. Стеклянная палочка.

2.6.4 Описание (ход) работы:

Группы крови — нормальные передающиеся по наследству различные иммунологические признаки крови. На основании этих признаков всех людей подразделяют на четыре группы вне зависимости от расовой принадлежности, возраста и пола. Группа крови у человека остается постоянной в течение всей его жизни. Люди одной группы крови отличаются от людей других групп крови наличием или отсутствием у них агглютиногенов (А и В), содержащихся в эритроцитах, и агглютининов а и р, содержащихся в сыворотке. Группы крови системы АBO : 0(1) группа крови содержит агглютинины а и Р, агглютиногены в ней отсутствуют; А (II) группа крови — агглютинин а и агглютиноген А; В(Ш) группа крови — агглютинина и агглютиноген В; AB(IV) группа крови — содержит агглютиногены А и В, агглютинины отсутствуют.

Реципиент — человек, которому переливают кровь, донор — человек, дающий свою кровь для переливания. Идеально совместимой для реципиента является кровь такой же группы. Кровь абсолютно несовместима, если у реципиента имеются агглютинины к эритроцитам донора, так как в этих случаях происходит соединение агглютиногена А одной крови с агглютинином а другой или агглютиногена В с агглютинином р. Развивается так называемая агглютинация, т. е. склеивание эритроцитов в маленькие и большие комочки.

Переливание несовместимой крови приводит к тяжелым последствиям и может быть причиной смерти. Реципиенту 0(1) группы нельзя переливать кровь никакой другой группы, кроме той же. У реципиента AB(IV) группы никаких агглютининов нет, поэтому ему можно переливать кровь всех групп. Реципиент AB(IV) группы — универсальный

реципиент. Кровь 0(1) группы можно перелить людям с любой группы крови. Поэтому людей с 0(1) группой называют универсальными донорами. Помимо агглютиногенов А и В, в эритроцитах встречаются иногда и другие агглютиногены (например, резус-фактор и др.). В тех случаях, когда кровь несовместима по резус-фактору, производить переливание также нельзя во избежание серьезных осложнений, связанных с разрушением эритроцитов (гемолизом). Перед каждым переливанием крови, проводимым по назначению и под наблюдением врача, необходимо обязательно проводить определение группы крови и выявлять ее совместимость.

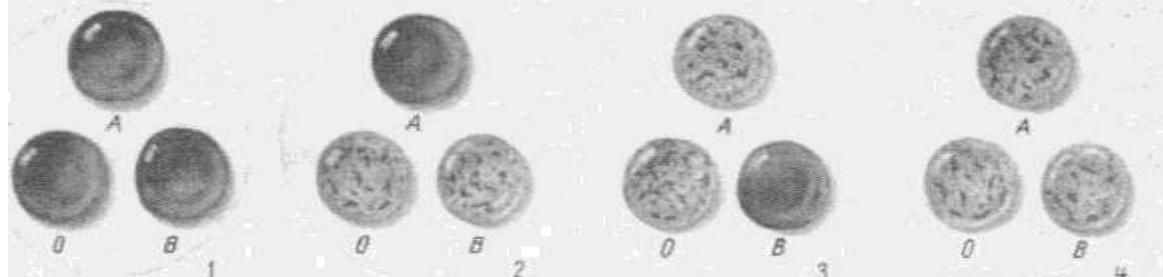


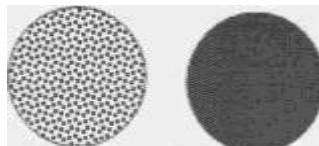
Рис. 1—4. Определение групп крови со стандартными сыворотками (А, В, 0). Рис. 1. Испытуемая кровь группы 0(1). Рис. 2. Испытуемая кровь группы А (II). Рис. 3. Испытуемая кровь группы В (III). Рис. 4. Испытуемая кровь группы АВ (IV).

Поликлоны изготавливаются из асцитной жидкости мышей - носителей анти-D и анти-C гибридом. Поликлоны Анти-D, Анти-C, Анти-с предназначены для определения резус принадлежности крови.

Ход определения. На планшет индивидуальными пипетками наносятся поликлоны Анти-D, Анти-C, Анти-с по одной большой капле (0,1мл). Рядом с каплями антител наносится по одной маленькой капле исследуемой крови (0,01 мл). Кровь смешивается с реагентом. Наблюдаются ход реакции с поликлонами визуально при легком покачивании планшета в течение трех минут. Агглютинация эритроцитов с поликлонами обычно наступает в первые 3-5 сек., но наблюдение следует вести 3 минуты ввиду более позднего появления агглютинации с эритроцитами, содержащими слабые разновидности резус- антигена. При использовании термостатировать не требуется,

Интерпретация результатов. Результат реакции в каждой капле может быть положительным или отрицательным. Положительный результат выражается в агглютинации (склеивании) эритроцитов. Агглютинаты видны невооруженным глазом в виде мелких красных агрегатов, быстро сливающихся в крупные хлопья. При отрицательной реакции капля остается равномерно окрашенной в красный цвет, агглютинаты в ней не обнаруживаются.

Наличие агглютинации с Анти-D, Анти-C или Анти-с поликлонами свидетельствует о том, что кровь резус-положительная, а отсутствие агглютинации - что кровь резус- отрицательная.



Rh+ Rh-

2.7 Лабораторная работа № 7 (2 часа).

Тема: Определение физических показателей общеклинического анализа мочи: объем, цвет, прозрачность, плотность и др.

2.7.1 Цель работы:

1. Ознакомиться с методиками определения физических показателей мочи.
2. Овладеть методикой определения объема, цвета, прозрачности, плотности мочи.

2.7.2 Задачи работы:

1. Изучить методики определения физических показателей общеклинического анализа мочи.
2. Провести определение объема, цвета, прозрачности, плотности мочи.

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Предметные и покровные стекла.
2. Мерные цилиндры.
3. Ареометр - урометр.
4. Лакмусовая бумага.

2.7.4 Описание (ход) работы:

Результаты клинических лабораторных методов исследования мочи имеют большое диагностическое значение, позволяют оценить состояние пациента, осуществлять контроль за проводимым лечением. Результаты лабораторного исследования во многом зависят от правильной техники сбора биологического материала, подлежащего исследованию.

Правила сбора мочи:

Моча собирается в чистую сухую стеклянную или пластиковую посуду, объемом 200 мл и более с этикеткой, на которой указывается: ФИО пациента (больного), отделение, палата или номер участка, цель исследования, дата, подпись врача.

Подготовка пациента включает: методическую беседу медсестры с пациентом, тщательный туалет наружных половых органов, требования к особой подготовке к исследованию (при необходимости), соблюдение питьевого и диетического режима.

Правила сбора мочи зависят от целей исследования.

Хранение и транспортировка мочи:

Быстрая транспортировка мочи, короткий срок хранения

Использование одноразовой посуды для сбора проб

Хранение мочи: лучше при температуре +4 С в холодильнике, не более 1-1,5 часов (среда должна быть кислой)

Замораживать мочу нельзя

Предупредить испарение, воздействие света, разрушение микроорганизмами

Общий анализ мочи.

Однократное измерение количества мочи утренней порции не имеет диагностического значения.

Определить цвета и прозрачности мочи

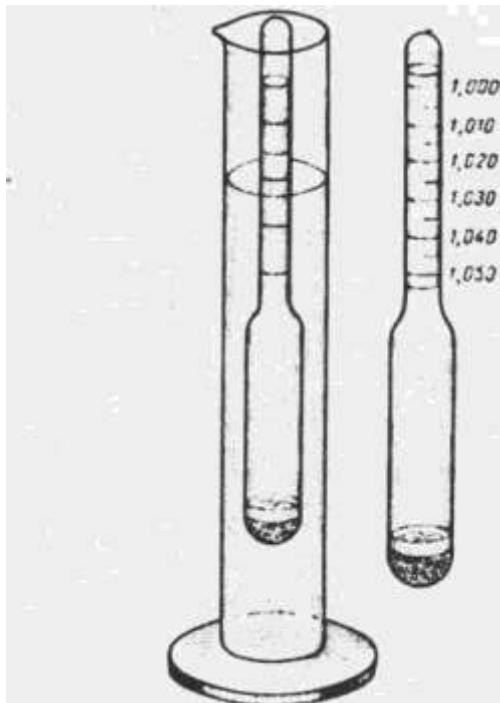
Цвет мочи.

Определяется в цилиндре из бесцветного стекла.

Цвет мочи в норме - все оттенки желтого. Придерживаются следующих обозначений цвета мочи: соломенный, соломенно-желтый, светло - желтый, насыщенно - желтый, кровянистый, оранжево - желтый, кирпичный, зеленовато - бурый - цвет «пива». При сахарном диабете, после обильного питья моча бледная, бесцветная. При усиленном потоотделении, при больших потерях воды организмом моча приобретает насыщенно - желтый цвет. При гемолитических состояниях - цвет крепкого чая. Прозрачность мочи. В норме свежевыпущенная моча прозрачна. Определяется в цилиндре в проходящем свете. Моча считается прозрачной, если через неё четко обозначаются все предметы. Различают 3 степени мутности мочи: мутноватая, мутная, очень мутная. Причину помутнения определяют при помощи микроскопии. Определить pH и относительную плотность мочи.

Реакция мочи (рН). В норме при смешанном питании реакция мочи слабо-кислой или нейтральной среды (рН 4,5 - 7,4). Реакция может меняться в зависимости от пищевого рациона. При употреблении преимущественно мясной пищи наблюдается сдвиг рН мочи в кислую сторону, при употреблении преимущественно растительной пищи - сдвиг рН в щелочную сторону. При патологии - резко кислая моча - наблюдается при лихорадочных состояниях, при сахарном диабете, при голодании. Щелочная моча - при циститах, пиелитах, при гематурии, после рвоты, поносов, при употреблении минеральных вод. Реакцию мочи определяют с помощью индикаторов:

- лакмуса: синяя лакмусовая бумага в кислой среде краснеет, красная лакмусовая бумага в щелочной среде синеет.
- универсального индикатора. рН = 7 - нейтральная среда рН менее 7 - кислая среда рН более 7 - щелочная среда



Определение относительной плотности мочи.

В норме в течение суток относительная плотность или удельный вес колеблется от 1,004 - 1,025.

Относительную плотность в моче измеряют с помощью специального ареометра - урометра - с делениями от 1,000 до 1,050. Глубина погружения урометра зависит от плотности жидкости: чем меньше относительная плотность мочи, тем глубже погружается урометр.

Измерение проводят в цилиндре на 50 мл, отсчет производят сверху вниз по нижнему мениску мочи - если моча прозрачная, или по верхнему мениску - если моча мутная. Если в цилиндре образовалась пена, то её необходимо снять при помощи фильтровальной бумаги. При размещении урометра в цилиндре урометр не должен касаться его стенок.

2.8 Лабораторная работа № 8 (2 часа).

Тема: Определение химических показателей общеклинического анализа мочи: рН, белок, нитриты, глюкоза, кетоновые тела, билирубин и уробилиноген.

2.8.1 Цель работы:

1. Ознакомиться с методиками определения химических показателей общеклинического анализа мочи.
2. Овладеть методиками определения белка, нитритов, глюкозы, кетоновых тел, билирубина и уробилиногена.

2.8.2 Задачи работы:

1. Изучить методики определения химических показателей общеклинического анализа мочи.
2. Провести определение белка, нитритов, глюкозы, кетоновых тел, билирубина и уробилиногена мочи.

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. 20% р-р сульфосалициловой кислоты или 50% р-ра азотной кислоты.
2. Центрифуга.
3. 1% спиртовой р-р йода.

4. 10% р-р едкого натра.

5. Реактивом Гайнеса.

2.8.4 Описание (ход) работы:

Качественное и количественное определение белка в моче.

Нормальные показатели: белок в норме в моче содержится в минимальных количествах, которые не обнаружаются обычными качественными реакциями. Верхняя граница нормы белка в моче - 0,033 г/л. Если содержание белка выше этого значения, то качественные пробы на белок становятся положительными.

Клиническое значение определения:

Появление белка в моче называется протеинурия. Протеинурии могут быть ложными и почечными. Экстраваренальные протеинурии могут быть при наличии примесей белкового происхождения из половых органов (вагинитах, уретритах и др.), количество белка при этом незначительно - до 0,01 г/л. Почечные протеинурии могут быть функциональными (при переохлаждении, физических нагрузках, лихорадке) и органическими - при гломерулонефрите, пиелонефрите, нефрите, нефрозах, почечной недостаточности. При почечных протеинуриях содержание белка может быть от 0,033 до 10-15 г/л, иногда выше.

Качественное определение.

Принцип метода: основан на том, что белок под действием неорганических кислот коагулирует (становится видимым). Степень помутнения зависит от количества белка.

Обнаружение белка в моче с 20% сульфосалициловой кислотой.

Реактивы: 20% р-р сульфосалициловой кислоты. Оборудование: темный фон.

Ход исследования:

Требования к моче: моча должна быть кислой (или слабокислой) рН, должна быть прозрачной, для этого мочу центрифугируют. Щелочную мочу подкисляют до слабокислой реакции среды, используя для контроля индикаторную бумагу.

В 2 пробирки одинакового диаметра наливают по 2 мл подготовленной мочи. 1 пробирка - контроль, 2 - опыт. В опытную пробирку добавляют 4 капли 20% сульфосалициловой кислоты.

Результат отмечают на темном фоне.

При наличии белка, моча в опытной пробирке мутнеет.

Качественное определение белка в моче тест - полосками.

Для выявления протеинурий используют различные монотест - полоски: Альбуфан, Альбустикс, Биофан Е и политесты: Трискан, Нонафан и др.

Количественное определение.

Обнаружение белка в моче по методу Робертса - Стольникова.

Принцип метода: основан на том, что белок под действием неорганических кислот коагулирует (становится видимым). Степень помутнения зависит от количества белка (т.е. кольцевая проба Геллера). При концентрации белка в моче 0,033 г/л к концу 3 минуты после насыщения мочи появляется тонкое нитевидное белое кольцо.

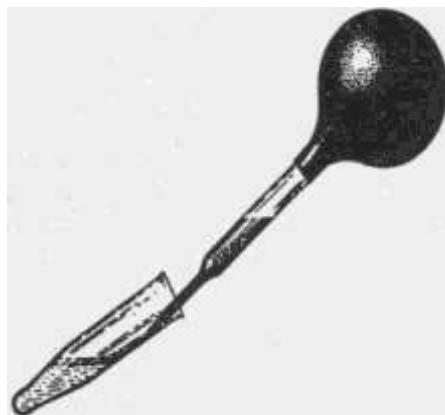
Реактивы: 50% р-р азотной кислоты или реактив Робертса (98 частей насыщенного раствора поваренной соли и 2 части концентрированной соляной кислоты) или реактив Ларионовой (98 частей насыщенного р-ра поваренной соли и 2 части концентрированной азотной кислоты).

Оборудование: темный фон.

Ход исследования:

Требования к моче: моча должна быть кислой (или слабокислой) рН, должна быть прозрачной, для этого мочу центрифугируют. Щелочную мочу подкисляют до слабокислой реакции среды, используя для контроля индикаторную бумагу.

В пробирку наливают 2 мл 50% р-ра азотной кислоты или один из реактивов, затем осторожно по стенке пробирки с помощью пипетки насыпают такой же объем



образуется

тонкое

подготовленной мочи
Пробу оставляют на 3
минуты

Через 3 минуты
отчитывают результат. Результат
отмечают на темном фоне в
проходящем свете. Если кольцо
широкое, компактное, то мочу
разводят дистиллированной водой
и вновь наслаживают на реактив.

Мочу разводят до тех пор,
пока через 3 минуты не
нитевидное кольцо.

производят по формуле:
 $C = 0,033g/l \times \text{степень}$
 разведения.

Расчет содержания белка в моче

Качественное и количественное определение сахара в моче.

В моче здорового человека сахар не содержится, он появляется в моче при нарушениях углеводного обмена, некоторых физиологических состояниях. Этот тест включен в общий анализ мочи.

Проба с реактивом Гайнеса (унифицированная проба)

Принцип метода: глюкоза легко окисляется, восстанавливая при этом металлы (медь).

Реактив Гайнеса: щелочной раствор сульфата меди (11) - синего цвета.

Ход определения.

К 4 мл реактива Гайнеса в пробирке вносят 8-10 капель мочи Кипятят на водяной бане 1-2 минуты.

При наличии сахара в моче образуется коричневый или оранжевый осадок оксида меди (1).

Количественное определение. Проводят только после положительной качественной реакции.

Колориметрическое определение сахара в моче по шкале Альтгаузена.

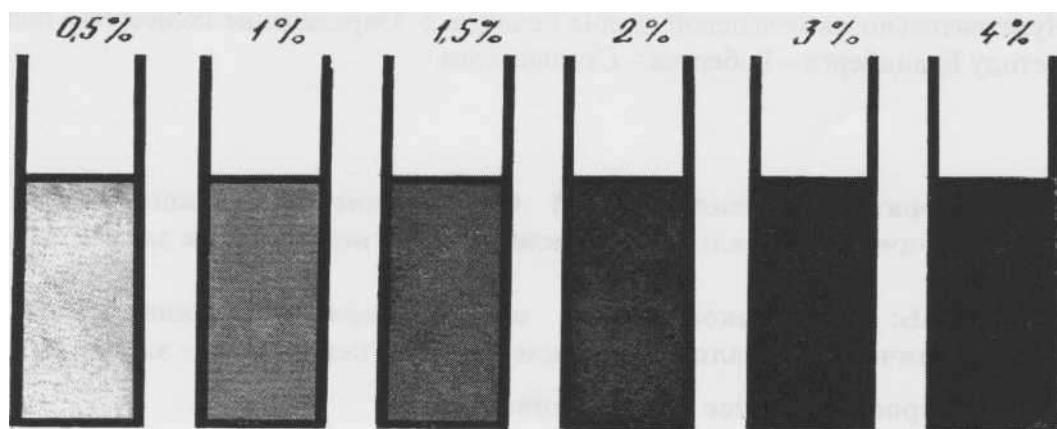
Реактивы: 10% р-р едкого натра (гидроксида натрия)

Ход определения:

К 4 мл мочи в пробирке добавить 1 мл 10% р-р едкого натра кипятят на водяной бане 1 минуту.

При наличии сахара в моче образуется окрашивание (от желтого до бурого).

Окраску раствора сравнивают с цветом стандартной шкалы



Результат отмечают в % по шкале.

Определение ацетоновых или кетоновых тел в моче.

Ацетоновые или кетоновые тела - это продукты неполного окисления жирных кислот. К кетоновым (ацетоновым) телам относятся альфа — кетоглутаровая, бета - оксимасляная кислоты и ацетон. В норме у здоровых людей кетоновые тела обнаруживаются после длительного голодания, после длительного приема жирной пищи, лишенной углеводов. В патологии - при сахарном диабете, при токсикозах беременных, при лихорадке, при поносе и рвоте у детей.

При выявлении сахара в моче проводят обязательное исследование на кетоновые тела: экспресс - тестами (кетофан) или пробой с нитропруссидом натрия.

В норме кетоновых тел не обнаруживают - реакция отрицательная.

Определение желчных пигментов в моче.

Проводится, если цвет мочи темно - желтый, коричневый или зеленоватый. Желчные пигменты (билирубин) в моче встречаются при поражении печени или желчных путей, т.е. при паренхиматозной и механической желтухе.

Проба Трусско - Розина.

Принцип метода: под действием йода происходит окисление желто-коричневого билирубина в биливердин зеленого цвета.

Реактив: 1% спиртовой р-р йода (или р-р Люголя).

Ход определения:

В пробирку наливают 4-5 мл мочи

Осторожно по стенке насылаивают на мочу раствор йода.

При положительной реакции на границе жидкостей появляется устойчивое зеленое кольцо.

2.9 Лабораторная работа № 9 (2 часа).

Тема: *Определение микроскопических показателей общеклинического анализа мочи: клеточные и неклеточные элементы осадка мочи.*

2.9.1 Цель работы:

1. Ознакомиться с методиками определения микроскопических показателей мочи.
2. Овладеть методиками определения клеточных и неклеточных элементов осадка мочи.

2.9.2 Задачи работы:

1. Изучить методики определения микроскопических показателей общеклинического анализа мочи.
2. Провести определение клеточных и неклеточных элементов осадка мочи.

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Предметные и покровные стекла.
2. Центрифуга.
3. Микроскоп.

2.9.4 Описание (ход) работы:

Микроскопическое исследование мочи.

Техника приготовления нативного препарата. Мочу из банки тщательно перемешивают и наливают в центрифужную пробирку на 10 мл. Центрифугируют 5-7 мин при 1500 об/мин. Пробирки в центрифуге должны быть уравновешены.

Затем мочу сливают, оставляя осадок, который перемешивают и наносят каплю осадка на предметное стекло, накрывают покровным

Приготовленный препарат помещают на столик микроскопа и микроскопируют сначала на малом (7x8), а затем на среднем (7x40) увеличении, просматривая весь препарат.

Организованные (органические) осадки мочи

Эритроциты - отсутствуют

Лейкоциты в норме 2-3 п/зр (у мужчин) и до 6 п/зр (у женщин)

Эпителиальные клетки:

- плоский эпителий - единично
- переходный эпителий 0 - 1 в препарате
- почечный эпителий - отсутствует

зернистые, восковидные, лейкоцитарные, эритроцитарные - в норме отсутствуют.

норме отсутствуют.

Осадки мочи делятся на 2 типа: организованные и неорганизованные.

Неорганизованные (неорганические) осадки мочи. Осадки кислой мочи: мочевая кислота, аморфные ураты (розовый осадок), оксалаты (в виде почтовых конвертов). Осадки щелочной мочи: трипельфосфаты (в виде гробовых крышечек), мочекислый аммоний, аморфные фосфаты (белый осадок). Большого диагностического значения не имеют. При патологии могут покрывать все поле зрения.

Диагностическое значение имеет наличие в неорганизованном осадке кристаллов цистина, лейцина, холестерина, билирубина, гемосидерина. Цилинды: гиалиновые, эпителиальные,

Цилиндроиды - в

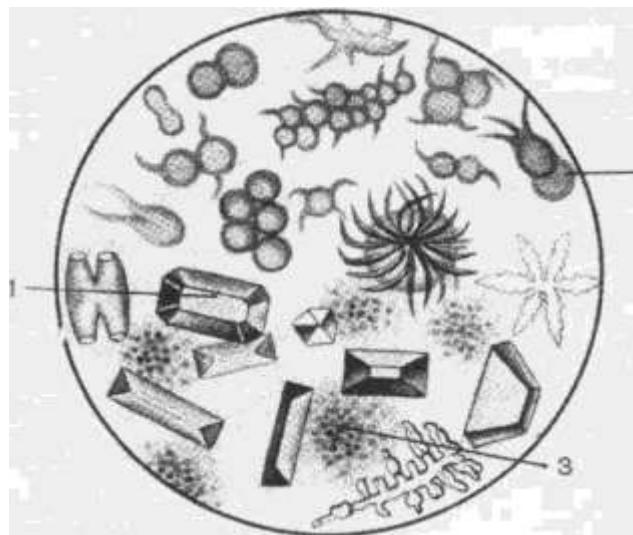


Рисунок 1

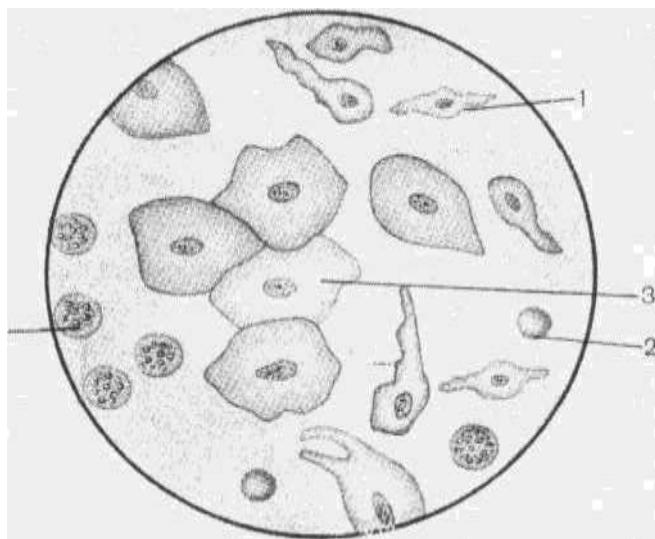


Рисунок 2

Рисунок 1. Неорганизованные осадки мочи - соли кислой мочи, 1- кристаллы мочевой кислоты, 2 - аморфные ураты, 3 - оксалаты.

Рисунок 2. Неорганизованные осадки мочи - соли щелочной мочи, 1 - кристаллы трипельфосфата, 2- кислый мочекислый аммоний, 3- аморфные фосфаты. Рисунок 3. Организованные осадки мочи.

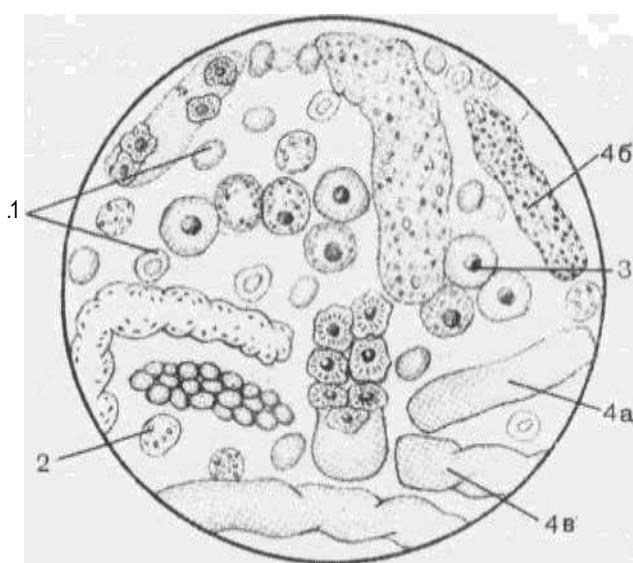


Рисунок 3

1 - полиморфный эпителий, 2 - эритроцит, 3 - плоский эпителий 4 - лейкоциты.

Рисунок 4. Организованные осадки патологической мочи

1- выщелоченные эритроциты, 2 - лейкоциты, 3 - почечный эпителий, 4- цилиндры: а - гиалиновые, б - зернистые, в - восковидные.

Рисунок 5. Прочие осадки мочи.

1 - слизь, 2 - цилиндроиды, 3- уретральные нити, 4- сперматозоиды.

Рисунок 6. Оснащение для проведения пробы Зимницкого

Проводится для решения вопроса о степени гематурии, лейкоцитурии, скрытой гематурии и лейкоцитурии. Унифицированными методами определения количества форменных элементов в моче являются: пробы по Нечипоренко.

Нормальные показатели: лейкоциты: не более 2000 в 1 мл мочи, эритроциты: не более 1000

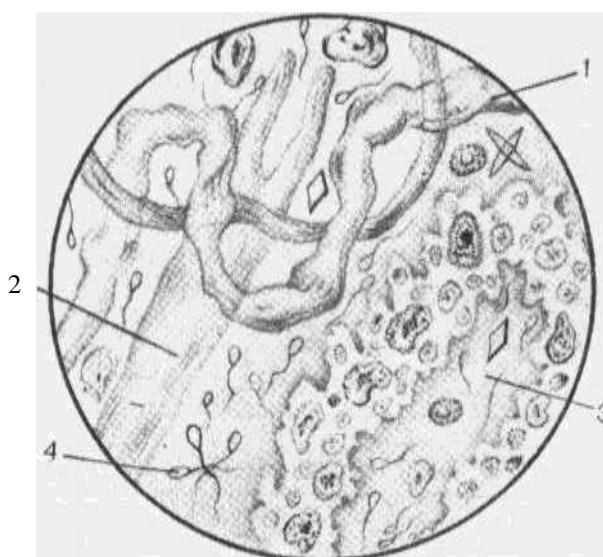


Рисунок 4

в 1 мл мочи. Проба по Амбурже. Нормальные показатели: лейкоциты: не более 2000 в 1 мин, эритроциты: не более 1000 в 1 мин.

Проба по Ад лис - Каковскому. Нормальные показатели: лейкоциты: не более 2млн за 24 часа, эритроциты: не более 1млн за 24 часа; цилиндры не более 20 000 за 24 часа.

2.10 Лабораторная работа № 10 (2 часа).

Тема: *Оценка результатов определения общеклинического анализа мочи при основных формах патологии почек и мочевыводящих путей и их интерпретация.*

2.10.1 Цель работы: 1. Оценить результаты определения общеклинического анализа мочи разных пациентов при патологии почек и мочевыводящих путей.

2.10.2 Задачи работы:

1. Интерпретировать результаты определения общеклинического анализа мочи разных пациентов при патологии почек и мочевыводящих путей.

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Результаты общеклинического анализа мочи разных пациентов.
2. Таблица нормы показателей мочи человека.

2.10.4 Описание (ход) работы:

В ходе выполнения лабораторной работы необходимо оценить результаты определения общеклинического анализа мочи разных пациентов при патологиях почек и мочевыводящих путей представленные ниже и диагностировать заболевание:

Общеклинический анализ мочи № 1 Дата 12.04.08 Ф.И.О. Иванов А.А. год. рождения 1988		
Показатели		Норма
Количество, мл	50	
Плотность, г/мл	1,033	1,008-1,025
Цвет	коричневый	Сол.-желт.
Прозрачность	мутная	Полная
pH	5,5	Слабоокисл.
Белок, г/л	2,5	—
Глюкоза, г/л	—	—
Кетоновые тела	—	—
Билирубин	—	—

Эритроциты, в п/зр	Сотни	0-1
Цилиндры, в п/зр	Гиал. 0-1	Гиал. 0-1
Бактерии, в п/зр	-	-
Соли, слизь	Ураты +	
Уробилиноген, мкмоль/л	-	17
Эпителий плоский, в п/зр	0-1	0-2
Эпителий цилиндрический, в п/зр	-	0-1
Эпителий почечный, в п/зр	3-5	-
Лейкоциты, в п/зр	6-8	0-2

Общеклинический анализ мочи № 2 Дата 12.04.08 Ф.И.О.
Иванов А.А. год. рожд. 1988

Показатели		Норма
Количество, мл	120	
Плотность, г/мл	1,006	1,008 -1,025
Цвет	Сол.- желт.	Сол.- желт.
Прозрачность	неполн ая	полная
pH	5,5	Слабо кисл.
Белок, г/л	4,3	-
Глюкоза, г/л	-	-
Кетоновые тела	-	-
Билирубин	-	-
Уробилиноген, мкмоль/л	-	17
Эпителий плоский, в п/зр	0-1	0-2
Эпителий цилиндрический, в п/зр	-	0-1
Эпителий почечный, в п/зр	-	-
Лейкоциты, в п/зр	0-1	0-2
Эритроциты, в п/зр	10-15	0-1
Цилиндры, в п/зр	1-2	Гиал. 0-1
Бактерии, в п/зр	-	-
Соли, слизь	+	Ураты
Примечание:		

Общеклинический анализ мочи № 3 Дата 12.04.08 Ф.И.О. Иванов А.А. год. рожд. 1988		
Показатели		Норма
Количество, мл	50	
Плотность, г/мл	1,035	1,008 -1,025
Цвет	желт.	Сол.- желт.
Прозрачность	неполная	Полная
pH	4,3	Слаб окисл.
Белок, г/л	25,5	-
Глюкоза, г/л	-	-
Кетоновые тела	-	-
Билирубин	-	-
Уробилиноген, мкмоль/л	-	17
Эпителий плоский, в п/зр	0-1	0-2
Эпителий цилиндрический, в п/зр	0-1	0-1
Эпителий почечный, в п/зр	5-10	-
Лейкоциты, в п/зр	5-15	0-2
Эритроциты, в п/зр	0-1	0-1
Цилиндры, в п/зр	Гиал., зернист. 3-5	Гиал. волосковидн.
Общеклинический анализ мочи № 4 Дата 12.04.08 Ф.И.О. Иванов А.А. год, рожд. 1988		
Бактерии, в п/зр	-	-
Соли, слизь	Ураты +, слизь +	
Примечание:		

Показатели		Норма
Количество, мл	200	
Плотность, г/мл	1,008 1,008	1,008 -1,025
Цвет	Сол.- желт.	Сол.- желт.
Прозрачность	Мутная	Полна
рн	7,5	Слаб окисл.
Белок, г/л	1,5	-
Глюкоза, г/л	-	-
Кетоновые тела	-	-
Билирубин	-	-
Уробилиноген, мкмоль/л	-	17
Эпителий плоский, в п/зр	3-5	0-2
Эпителий цилиндрический, в п/зр	2-4	0-1
Эпителий почечный, в п/зр	3-5	-
Лейкоциты, в п/зр	10-15	0-2
Эритроциты, в п/зр	0-1	0-1
Цилиндры, в п/зр	0-2 гигал., -1	Гигал.0
Бактерии, в п/зр	+++	-
Соли, слизь	Окс++ +, фосфат ъгН-, ,	
Примечание:		

Общеклинический анализ мочи № 5 Дата 12.04.08 Ф.И.О. Иванов А.А.
год. рожд. 1988

Показатели		Норма
Количество, мл	250	
Плотность, г/мл	1,006	1,008 -1,025

Цвет	светлая	Сол.-желт.
Прозрачность	Полная	Полная
pH	5,5	Слаб окисл.
Белок, г/л	1,2	-
Глюкоза, г/л	-	-
Кетоновые тела	-	-
Билирубин	-	-
Уробилиноген, мкмоль/л	-	17
Эпителий плоский, в п/зр	0-2	0-2
Эпителий	-	0-1
Эпителий почечный, в	-	-
Лейкоциты, в п/зр	3-5	0-2
Эритроциты, в п/зр	1-2	0-1
Цилиндры, в п/зр	Гиал.0-1	Гиал.0-1
Бактерии, в п/зр	-	-
Соли, слизь	Ураты +	
Примечание: суточный диурез 2800 мл		

Общеклинический анализ мочи № 6 Дата 12.04.08 Ф.И.О. Иванов А.А. год. рожд. 1988		
---	--	--

Показатели		Норма
Количество, мл	10	
Плотность, г/мл	1,027	1,008 -1,025
Цвет	Темно- бур.	Сол.- желт.
Прозрачность	Мутна я	Полна я
pH	5,0	Слабо кисл.
Белок, г/л	120	-

Глюкоза, г/л	-	-
Кетоновые тела	-	-
Билирубин	-	-
Уробилиноген, мкмоль/л	-	17
Эпителий плоский, в п/зр	0-1	0-2
Эпителий цилиндрический, в п/зр	0-1	0-1
Эпителий почечный, в п/зр	3-5	-
Лейкоциты, в п/зр	0-1	0-2
Эритроциты, в п/зр	0-1	0-1
Цилиндры, в п/зр	-	Гиал.0 -1
Бактерии, в п/зр	-	-
Соли, слизь	-	
Примечание: суточный диурез 370 мл		

Общеклинический анализ мочи № 7 Дата 12.04.08 Ф.И.О.
Иванов А.А. год. рожд. 1988

Показатели		Норма
Количество, мл	50	
Плотность, г/мл	1,033	1,008 -1,025
Цвет	Темно-крас.	Сол.-желт.
Прозрачность	Мутная	Полна
pH	5,2	Слабо кисл.
Белок, г/л	1,5	—
Глюкоза, г/л	—	—
Кетоновые тела	—	—
Билирубин	—	—
Уробилиноген, мкмоль/л	—	17
Эпителий плоский, в п/зр	0-2	0-2
Эпителий цилиндрический, в п/зр	—	0-1
Эпителий почечный, в п/зр	-	-

Лейкоциты, в п/зр	2-4	0-2
Эритроциты, в п/зр	3-5	0-1
Цилиндры, в п/зр	Гиал.0-1	Гиал.0-1
Бактерии, в п/зр	-	-
Соли, слизь	Урат ЬІ++	
Примечание: суточный диурез 550 мл		

Общеклинический анализ мочи № 8 Дата 12.04.08 Ф.И.О.
Иванов А.А. год. рожд. 1988

Показатели		Норма
Количество, мл	420	
Плотность, г/мл	1,032	1,008 -1,025
Цвет	Сол.- желт.	Сол.- желт.
Прозрачность	Полная	Полная
pH	5,3	Слабо окисл
Белок, г/л	-	-
Глюкоза, г/л	3,5	-
Кетоновые тела	+++	-
Билирубин	-	-
Уробилиноген, мкмоль/л	-	17
Эпителий плоский, в п/зр	0-1	0-2
Эпителий цилиндрический, в п/зр	-	0-1
Эпителий почечный, в п/зр	-	-
Лейкоциты, в п/зр	0-3	0-2
Эритроциты, в п/зр	0-1	0-1
Цилиндры, в п/зр	1	Гиал.0- -1
Бактерии, в п/зр	-	-
Соли, слизь	-	
Примечание: суточный диурез 2700 мл		

Общеклинический анализ мочи № 9 Дата 12.04.08 Ф.И.О. Иванов А.А. год. рожд. 1988		
Показатели		Норма
Количество, мл	220	
Плотность, г/мл	1,022	1,008 -1,025
Цвет	Темно-кор.	Сол.-желт.
Прозрачность	неполная	Полная
pH	5,3	Слабоокисл
Белок, г/л	-	-
Глюкоза, г/л	-	-
Кетоновые тела	-	-
Билирубин	++	-
Уробилиноген, мкмоль/л	25	17
Эпителий плоский, в п/зр	0-1	0-2
Эпителий цилиндрический, в п/зр	-	0-1
Эпителий почечный, в п/зр	-	-
Лейкоциты, в п/зр	0-2	0-2
Эритроциты, в п/зр	0-1	0-1
Цилиндры, в п/зр	Гиал.0-1	Гиал.0-1
Бактерии, в п/зр	-	-
Соли, слизь	-	-
Примечание:		

Общеклинический анализ мочи № 10 Дата 12.04.08 Ф.И.О. Иванов А.А. год. рожд. 1988		
Показатели		Норма
Количество, мл	220	
Плотность, г/мл	1,022	1,008 -1,025
Цвет	алая	Сол.- желт.
Прозрачность	неполн ая	Полна я
pH	5,3	Слабо окисл.
Белок, г/л	1,5	—
Глюкоза, г/л	—	—
Кетоновые тела	—	—
Билирубин	—	—
Уробилиноген, мкмоль/л	—	17
Эпителий плоский, в п/зр	0-1	0-2
Эпителий цилиндрический, в п/зр	—	0-1
Эпителий почечный, в п/зр	—	—
Лейкоциты, в п/зр	0-2	0-2
Эритроциты, в п/зр	сплошь	0-1
Цилиндры, в п/зр	1	Гиал.0- -1
Бактерии, в п/зр	—	—
Соли, слизь	—	
Примечание:		

2.11 Лабораторная работа № 11 (2 часа).

Тема: Проведение микроскопического и иммуноферментного экспресс-методов микробиологической диагностики.

2.11.1 Цель работы:

1. Ознакомиться с методикой проведения микроскопического и иммуноферментного экспресс-метода микробиологической диагностики.
2. Овладеть методикой иммуноферментного экспресс-метода микробиологической диагностики.

2.11.2 Задачи работы:

1. Изучить методику проведения микроскопического экспресс-метода.
2. Изучить методику иммуноферментного экспресс-метода микробиологической диагностики.

2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Планшеты.
2. Автоматический промыватель планшета.
3. Набор ИФА тестов.
4. Шейкер.
5. Инкубатор

2.11.4 Описание (ход) работы:

Реакции гиперчувствительности.

Методы иммунного анализа широко вошли в медицинскую практику. Во всех областях современной медицины используется иммунный анализ, преимущественно, с диагностической и аналитической целями. Особенно важно, что они дают возможность идентифицировать биологические компоненты (гормоны, ферменты, нейропептиды, продукты иммунной системы, антигены и т.д.) в низких и очень низких концентрациях. Все продукты, против которых возможно получение антител, выявляются этими методами.

Иммунный анализ основывается на взаимодействии антигена (АГ) и антитела (АТ) с использованием различных вариантов мечения одного из компонентов (фермент, радионуклид, флуоресцентный краситель и другие). Оценка реакции проводится автоматически на специальной аппаратуре, что позволяет стандартизировать эти методы.

В зависимости от типа используемой метки и условий постановки теста иммунный анализ обозначается как иммуноферментный (ИФА), радиоиммунный (РИА), иммунофлуоресцентный и другие. При постановке реакций в один или несколько этапов они обозначаются как прямые или непрямые. Имеет значение среда, в которой проводится реакция. Если реакция проводится с реагентами, фиксированными на поверхности, то тест обозначается как твердофазный, например ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

Иммуноферментный анализ. ИФА появился в середине 60-х годов и первоначально был разработан как метод для идентификации антигена в гистологическом препарате, а также для визуализации линий преципитации в teste иммунодифузии и иммуноэлектрофореза, а затем стал использоваться для количественного определения антигенов и антител в биологических жидкостях. В разработке метода принимали участия Е. Энгвалл и Р. Пэлман, а также независимо от них В. Ван Вееман и Р. Шуре.

Метод основан на специфическом связывании антитела с антигеном, при этом один из компонентов конъюгирован с ферментом, в результате реакции с соответствующим хромогенным субстратом образовывается окрашенный продукт, количество которого можно определить спектрофотометрически (рис. 1).

Открытие возможности иммобилизации антигена и антитела на различных носителях с сохранением их связывающей активности позволило расширить использование ИФА в различных областях биологии и медицины.

Появление моноклональных антител послужило дальнейшему развитию ИФА, что позволило повысить его чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов.

Ознакомится с принципом постановки ИФА.

Теоретически ИФА основывается на данных современной иммунохимии и химической энзимологии, знании физико-химических закономерностей реакции антиген-антитело, а также на главных принципах аналитической химии. Чувствительность ИФА и

время его проведения определяется несколькими основными факторами: кинетическими, термодинамическими характеристиками реакции антиген-антитело, соотношением реагентов, активностью фермента и разрешающей способностью методов его детекции. В общем виде реакция антиген-антитело может быть описана простой схемой:



Разнообразие объектов исследования от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий, а также необычайно широкий круг задач, связанных с многообразием условий применения ИФА, обусловливают разработку чрезвычайно большого количества вариантов этого метода.

Любой вариант ИФА содержит 3 обязательные стадии:

1. стадия узнавания тестируемого соединения специфическим к нему антителом, что ведет к образованию иммунного комплекса;
2. стадия формирования связи конъюгата с иммунным комплексом или со свободными местами связывания;
3. стадия превращения ферментной метки в регистрируемый сигнал.

Классификация ИФА.

В основу классификации методов ИФА положено несколько подходов:

1. По типу реагентов, присутствующих на первой стадии ИФА, различают конкурентный и неконкурентный методы.

А) В конкурентном ИФА на первой стадии в системе присутствуют одновременно анализируемое соединение и его аналог, меченный ферментом и конкурирующий за центры специфического связывания с ним.

Б) Для неконкурентных методов характерно присутствие в системе на первой стадии только анализируемого соединения и специфичных к нему центров связывания.

2. Все методы ИФА делятся на гомогенные и гетерогенные.

Если все три стадии ИФА проходят в растворе и между основными стадиями нет дополнительных этапов разделения образовавшихся иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов, метод относится к группе гомогенных.

В основе гомогенного ИФА, применяемого, как правило, для определения низкомолекулярных субстанций, лежит ингибирования активности фермента при его соединении с антигеном или антителом. Активность фермента восстанавливается в результате реакции антиген-антитело.

При связывании антитела с антигеном, содержащим ферментную метку, происходит ингибирование активности фермента на 95% по отношению к высокомолекулярному субстрату, что обусловлено стерическим исключением субстрата из активного центра фермента. По мере увеличения концентрации антигена связывается все больше антител и сохраняется все больше свободных конъюгатов антиген-фермент, способных гидролизовать высокомолекулярный субстрат. Анализ проводят очень быстро, для одного определения требуется 1 минута. Чувствительность метода достаточно высока. С его помощью можно определить вещество на уровне пикомолей.

Для гетерогенных методов характерно проведение анализа в двухфазной системе с участием твердой фазы - носителя, и обязательная стадия разделения иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов (отмывка), которые находятся в разных фазах (образовавшиеся иммунные комплексы находятся на твердой фазе, а непрореагировавшие комплексы - в растворе). Гетерогенные методы, в которых формирование иммунных комплексов на первой стадии протекает на твердой фазе, называют твердофазными методами.

Методы относятся к гомогенно- гетерогенным, если 1 стадия - образование специфических комплексов происходит в растворе, а затем для разделения компонентов используют твердую фазу с иммобилизованным реагентом.

3. По принципу определения тестируемого вещества:

А) Прямое определение концентрации вещества (антигена или антитела) по числу

приводимых с ним центров связывания. В этом случае ферментная метка будет находиться в образовавшемся специфическом комплексе АГ-АТ. Концентрация определяемого вещества будет прямо пропорциональна регистрируемому сигналу.

Б) Определение концентрации вещества по разности общего числа мест связывания и оставшихся свободными центров связывания. Концентрация определяемого вещества при этом будет возрастать, а регистрируемый сигнал снижаться, следовательно, в данном случае прослеживается обратная зависимость от величины регистрируемого сигнала.

Характеристика компонентов, используемых в ИФА.

Ферменты.

Ферментные метки обладают чрезвычайно мощным катализитическим действием, одна молекула фермента может реагировать с большим количеством молекул субстрата. Таким образом, фермент, присутствующий в ничтожных количествах, можно выявить и количественно определить по образованию продуктов, катализируемой им реакции. Другое преимущество применения ферментов в качестве меток обусловлено наличием в молекуле многочисленных функциональных групп (сульфогидрильных, карбоксильных, остатков тиазина и др.), через которые можно ковалентно присоединить молекулы лиганда.

Ферментные маркеры, используемые в ИФА, должны обладать следующими свойствами:

- высокая активность и стабильность фермента в условиях анализа, при модификации и в коньюгате с антителами или другими белками;

- наличие чувствительных субстратов и простота метода определения продуктов или субстратов ферментативной реакции;

- возможность адаптации субстратных систем к дальнейшему усилению;

- отсутствие фермента и его ингибиторов в исследуемой биологической жидкости.

В ИФА может использоваться не менее 15 различных ферментов. Наибольшее применение, в соответствии с вышеназванными требованиями, нашли пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфотаза (ЩФ) и Р-Д-галактозидаза (табл.1). Все три стабильны и катализируют высокочувствительные реакции. Кроме того, продукты, получаемые в результате реакций, катализируемых этими ферментами, в зависимости от используемого субстрата, могут выявляться не только колориметрическими методами, но также флуоресцентными методами. Другие ферменты используются значительно реже. Это объясняется их более низкой в сравнении с ПХ и ЩФ удельной активностью.

Субстраты.

Выбор субстрата в первую очередь определяется используемым в качестве метки ферментом, так как реакция фермент-субстрат высоко специфична.

Основные требования к субстрату:

- обеспечение высокой чувствительности метода при выявлении фермента в коньюгате;

- образование хорошо учитываемых (например, окрашенных) продуктов реакции фермент-субстрат;

- субстрат должен быть безопасным, дешевым, доступным и удобным для применения.

Ферменты и их субстраты наиболее широко используемые в ИФА.

Фермент	Источник получения	М.М. (кДа)	Субстрат (рекомендуемая длина волны при фотометрии, нм)	Конъюгирующий реагент
Пероксидаза	(Armoracia rusticana)	40	0-фенилендиаминдигидрохлорид (ОФД, 492 нм) 5-аминосалициловая кислота (450 нм), диаминобензидин, о-дианизидин.	Глутарал альдегид Мета-периодат натрия N-сукцинимид ол-3(2-пиридилдитио)пропионат
P-D-галак-тозидаза	E. Coli	540	О-нитрофенил-P-галактозид (420 нм)	D-Мета-малеимидобензол-N-гидроксисукцинимидный эфир
Щелочная фосфотаза	E.Coli, слизистая кишечника теленка	84-150	P-нитрофенилфосфат (405 нм), 5-Бром-4-хлоро-3-фосфат индолил	Глутарал альдегид

Чаще используют хромогенные субстраты, которые, разрушаясь, образуют окрашенное вещество. Перспективным является использование высокоэнергетических субстратов - флуоресцентных, хемилюминесцентных. Применение таких субстратов позволяет теоретически повысить чувствительность ИФА на два порядка. Антигены и антитела. АГ и АТ, используемые в ИФА, должны быть высокоочищенными и высокоактивными. Кроме того, АГ должны обладать высокой антигенностью, оптимальной плотностью расположения и количеством антигенных детерминант, чужеродностью и гомогенностью. Многие синтетические и рекомбинантные АГ вирусов, и бактерий хорошо себя зарекомендовали при использовании в ИФА. Это существенно

повысило специфичность и воспроизводимость метода за счет сведения к минимуму перекрестных реакций. Одним из наиболее важных реагентов в ИФА являются антитела. Чувствительность ИФА зависит от концентрации, активности и специфичности используемых антител. Используемые антитела могут быть поли- или моноклональными, различного класса (IgG или IgM) и подкласса (IgG1, IgG2), антиаллотипическими или антиидиотипическими. При низкой аффинности АТ распад комплекса АГ-АТ приводит к удалению связанного АГ из системы. Чувствительность и специфичность метода повышается при использовании моноклональных антител. В этом случае появляется возможность обнаруживать низкие концентрации АГ (АТ) в испытуемых образцах.

Образование конъюгата. Конъюгат - это антиген или антитело, меченные ферментной меткой. Образование конъюгата - один из важных этапов проведения ИФА.

При формировании конъюгата подбирают такой оптимальный метод введения ферментной метки, чтобы оба компонента конъюгата сохраняли свою биологическую

активность: фермент - способность взаимодействовать с субстратом, а антиген или антитело - антигенностю и антигенсвязывающую активность, соответственно. Наличие меченого, высокоочищенного антигена позволяет использовать конкурентные методы. В этом случае на конечном этапе можно измерять активность конъюгата, не связанного с иммобилизованными антителами, что позволяет избежать процедуры отмывки и делает анализ более удобным. Однако антигены разнообразны по своим физико-химическим свойствам и строению, а значит невозможно разработать универсальные методики для получения конъюгата с антигеном. В этом случае получение конъюгата антигена с ферментом представляет собой отдельную сложную задачу. Приготовление меченых антител для ИФА методически более доступно. Конъюгирование фермента с иммунохимически активными белками производится различными методами: химическая сшивка, ковалентное связывание молекулы фермента с АГ или АТ и образование соединений через нековалентные связи, например, когда связь между ферментом и АГ или АТ осуществляется иммунологически, через взаимодействие антиген-антитело.

Наиболее широкое распространение получили ковалентные способы приготовления конъюгатов. Выбор реакции связывания определяется типом доступных

функциональных групп в данных белковых молекулах. В качестве реагентов, используемых для введения фермента в молекулы антигенов и антител, используют глутаровый альдегид, перидат натрия и др.

Существует одноэтапный и двухэтапный методы получения конъюгатов с помощью глутарового альдегида. Могут образовываться конъюгаты различных размеров с редуцированной ферментативной активностью (15 - 60 % от свободного фермента). Образовавшийся конъюгат больших размеров может стерически затруднять определение тестируемого вещества. Конъюгаты с относительно низкой молекулярной массой состоят из Fab-фрагмента и одной молекулы фермента.

В результате двухэтапного синтеза, который заключается в поэтапном получении сначала модифицированного с помощью сивающего агента фермента, его выделении, а затем последующем взаимодействии его с антигеном (антителом), образуются молекулы однородного состава, содержащие 1-2 молекулы фермента на молекулу иммуноглобулина и сохраняющие высокую ферментативную и иммунологическую активность. Однако количество таких образовавшихся конъюгатов невелико (для пероксидазы хрена составляет 5 - 10 %). Наибольшее практическое применение нашел метод получения иммунопероксидазных конъюгатов, основанный на окислении углеводного компонента фермента перидатом натрия (связывание пероксидазы в конъюгат достигает 70-90 % от начального количества фермента). Надежный конъюгат должен обладать следующими свойствами:

- высоким антителенным тигром и высокой афинностью к антигену, чтобы его можно было использовать в большом разведении, и таким образом, уменьшить неспецифическое связывание;
- достаточной специфичностью в рабочем разведении;

- преобладанием мономерных форм над полимерными, т.к. полимерные формы имеют тенденцию к неспецифической адгезии на пластике, что приводит к высокому фоновому уровню реакции;

- оптимальным молярным соотношением между ферментом и антителами (оптимальное соотношение составляет около 1:1);

- достаточной ферментативной активностью конъюгата. Это свойство определяется главным образом условиями конъюгации и соотношением молекул фермента и антител в конъюгате.

Твердая фаза

В качестве твердой фазы для проведения ИФА можно применять различные материалы: полистирол, поливинилхлорид, полипропилен и другие вещества. Твердой фазой могут служить стенки пробирки, 96-луночные и др. планшеты, шарики, бусины, а также нитроцеллюлозные и другие мембранные, активно сорбирующие белки.

Иммобилизация антигена или антител на твердой фазе возможна тремя путями:

- пассивная адсорбция, основанная на сильных гидрофобных взаимодействиях между белками и синтетической поверхностью;

- ковалентное прикрепление к твердой фазе;

- иммунохимическое и др. (нековалентное и неадсорбционное присоединение).

Пассивная адсорбция белков широко используется при проведении ИФА на пластинах для титрования, на нитроцеллюлозных мембранных. Пассивная адсорбция идет по принципу насыщения и коррелирует с молекулярной массой адсорбируемого вещества. Адсорбционная поверхность мембран различного типа (нитроцеллюлоза, нейлон и др.) в 100-1000 раз выше, чем у пластика.

Полисахариды и сильногликозилированные белки часто имеют низкую аффинность для полистирола. Необходимы другие методы для их иммобилизации, например, ковалентное присоединение с помощью глутарового альдегида. Ковалентное присоединение эффективно, если в качестве твердой фазы используются гидрофильные бусы (агароза) и полистироловые бусы.

Иммунохимические методы основываются на использовании предварительно адсорбированных «ловушечных» антител для иммобилизации антигена или антител. Антиген, иммобилизованный иммунохимически, в 10 раз активнее, чем пассивно адсорбированный антиген. Могут использоваться лектины или иммуноглобулины-связывающие белки бактерий, которые легко адсорбируются на пластике или других гидрофобных поверхностях, например конканавалин А (Кон А) или стафилококковый белок А. Кон А способен иммобилизовать gp 120 - белок вируса ВИЧ.

Свободные сайты на поверхности твердой фазы, не связавшиеся с сорбируемым агентом, могут фиксировать в ходе теста другие молекулы, в том числе и конъюгаты, что приводит к повышению фонового сигнала. Для предотвращения неспецифического связывания после иммобилизации на твердую фазу основного материала проводят обработку нейтральными для теста веществами. Наиболее популярные блокирующие агенты - бычий сывороточный альбумин (БСА), казеин и др. Выбор блокирующего агента и условия проведения этого этапа зависят от типа твердой фазы, чувствительности системы.

2.11 Лабораторная работа № 12 (2 часа).

Тема: Биологический метод микробиологической диагностики.

2.12.1 Цель работы: 1. Ознакомиться с методикой проведения биологического метода микробиологической диагностики.

2.12.2 Задачи работы:

1. Изучить методику проведения биологического метода.

2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Препаровальный набор.
2. Вата.
3. Лабораторная мышь.

2.12.4 Описание (ход) работы:

Биологический метод диагностики.

Задача. В хирургическое отделение поступил больной с ранением голени. В отделяемом раны микроскопическим методом обнаружены грамположительные палочки. Чистую культуру бактериологическим методом выделить не удалось. С целью выделения возбудителя, изучения его вирулентных свойств исследуемый материал был доставлен в лабораторию для проведения биологической пробы. Проведите исследование и оцените его результат. Оформите протокол опыта.

Методика:

Экспериментальная инфекция. Закономерности инфекционного процесса могут быть изучены в биологическом методе диагностики при воспроизведении экспериментальной инфекции. Заражение экспериментальных животных может производиться с целью:

изучения вирулентности микробов;
воспроизведения и изучения инфекционного процесса;
испытания лечебного эффекта химиотерапевтических и иммунологических препаратов; выделения чистой культуры возбудителя и ее идентификации.

В зависимости от цели исследования пользуются различными способами заражения: внутрикожным, подкожным, внутримышечным, внутрибрюшным, внутривенным, пероральным или эндоназальным. Во всех случаях, за исключением перорального и эндоназального способов, заражение осуществляется с помощью шприца. Вскрытие трупов животных производится стерильными инструментами, соблюдая правила асептики. При вскрытии производят осмотр органов, осуществляют посев тканей и органов на питательные среды для бактериологического исследования, готовят мазки-отпечатки для обнаружения микроорганизмов, для изучения их вирулентных свойств (обнаружение каспул). Для оценки степени вирулентности микробов определяют LD₅₀ (доза микробов, вызывающая гибель 50% зараженных животных), а затем выделяют чистую культуру и изучают ее вирулентные свойства.

Изменения, обнаруженные при вскрытии трупа животного, а также результаты бактериологического исследования вносят в протокол вскрытия.

Помощник фиксирует мышь, держа ее головой вниз, при этом кишечник перемещается к диафрагме. Левой рукой оттягивают заднюю лапку в сторону, протирают спиртом паховую область и, чтобы не поранить кишечник, инъекции делают в нижнюю часть живота в середине паховой области. Направление иглы перпендикулярно телу мыши. Сначала прокалывается кожа, затем брюшная стенка и игла «прорывается» в брюшную полость. Этим методом вводится исследуемый материал в объеме 0,1 мл.

Зараженные животные помещаются в клетку, на которой приклеивают этикетку, где указывается дата заражения, количество зараженных животных, доза и использованный исследуемый материал.

После гибели животного производится вскрытие трупа с целью обнаружения возбудителя путем микроскопического исследования мазков-отпечатков из органов и выделения чистой культуры.

на специальную доску, покрытую ватой, смоченной дезинфицирующим раствором, помещают труп мышки вверх брюшком и фиксируют за лапки металлическими булавками;

вскрытие трупа производят стерильными инструментами;

проводят препаровку кожи от подлежащей ткани, вскрывают грудную полость, делают посев крови из сердца на кровяной агар и готовят мазок на предметном стекле;

вскрывают брюшную полость, осматривают органы брюшной полости, проводят посев ткани печени и селезенки (при необходимости других органов и тканей) на кровяной агар и готовят мазки-отпечатки из этих органов на предметном стекле. Микропрепараты окрасить, исследовать на обнаружение капсулы.

ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ: Цель:

Первый день				
Дата заражения	Вид животного	Материал для заражения		
Второй день				
Дата гибели животного	Дата вскрытия трупа животного	Результат микроскопического исследования		
		крови	печени	селезенки
Третий день				
Результат посева из органов (рисунок)				
крови	печени	селезенки		

2.13.1 Лабораторная работа № 13 (2 часа).

Тема: Серологический метод микробиологической диагностики.

2.13.1 Цель работы:

1. Ознакомиться с серологическими методами микробиологической диагностики
2. Овладеть методикой постановки реакции агглютинации классическим (пробирочным) методом

2.13.2 Задачи работы:

1. Изучить серологические методы микробиологической диагностики.
2. Провести исследование сыворотки крови крупного рогатого скота на бруцеллез.

2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Пипетки Флоринского.
2. Сыворотка крови крс.
3. Физиологический раствор.
4. Антиген.

2.13.4 Описание (ход) работы:

Серологический метод исследования

Реакции антиген—антитело

Особенности взаимодействия антитела с антигеном являются основой диагностических реакций в лабораториях.

Реакция *in vitro* между антигеном и антителом состоит из:

1. специфической
2. неспецифической фазы.

В специфическую фазу происходит быстрое специфическое связывание активного центра антитела с детерминантой антигена. Затем наступает неспецифическая фаза — более медленная, которая проявляется видимыми физическими явлениями, например образованием хлопьев (феномен агглютинации) или преципитата в виде помутнения. Эта фаза требует наличия определенных условий (электролитов, оптимального pH среды). С этой целью применяют серологические методы (от лат. *serum* — сыворотка и *logos* — учение), т. е. методы изучения антител и антигенов с помощью реакций антиген—антитело, определяемых в сыворотке крови и других жидкостях, а также тканях организма. Особую ценность имеет в том случае, если выделить возбудителя не представляется возможным. При этом необходимо выявить повышение титров АТ, в связи с чем исследуют парные образцы сыворотки, взятые в интервале 10 — 20 суток (иногда этот интервал может быть более длительным). Антитело обычно появляется в крови на 1-2ю неделю заболевания и циркулируют в организме относительно долго, что позволяет использовать их выявление для ретроспективных эпидемиологических исследований. Определение классов Ig четко характеризует этапы инфекционного процесса, а также может служить косвенным прогностическим критерием. Особое значение имеют методы выявления микробных Аг. В значимых количествах они появляются уже на самых ранних сроках, что делает их идентификацию важным инструментом экспресс — диагностики инфекционных заболеваний, а количественное их определение в динамике инфекционного процесса служит критерием эффективности проводимой антимикробной терапии. Сущность серологических методов исследования состоит в определении титра антител в сыворотке крови больного в динамике болезни по отношению к известному антигену, вводимому в серологическую реакцию. В клинической практике чаще всего используется реакция агглютинации (РА) Видаля, ее разновидности, РНГА, РСК и более информативные современные методы (ИФА, РИА, ЛИФА и др.). РА — определение неизвестных антител с помощью известных антигенов и установление вида возбудителя с помощью известных антител. РИГА и РНГА — более специфичны, используются меченные эритроциты. РТГА — основан на способности некоторых вирусов агглютинировать эритроциты. РИ — реакция иммунодиффузии, различная способность антигенов и антител диффундировать в геле. РСК титрование антигенов или антител по степени фиксации комплемента с комплексом антиген-антитело. РН — способность антител нейтрализовать токсины и антигены вирусов. ИФА — используются антитела, конъюгированные с ферментом. РИА — используется радиоактивная метка антигенов или антител. ЛИФА — лантанидный иммунофлюоресцентный анализ — используются в качестве метки элементы редкоземельных металлов. **Забор крови для серологического исследования** выполняется так же, как и при посеве, но в отличие от последнего, его лучше осуществлять самотеком, а не шприцом. Для этого берут иглу с более широким просветом и вводят в локтевую вену без шприца. В пробирку собирают 3—5 мл крови. При таком сборе эритроциты меньше травмируются и сыворотка крови реже бывает с явлениями гемолиза. После отстаивания и центрифugирования крови сыворотку с помощью пипетки переносят в другую пробирку или эпиндорф и хранят в холодильнике при температуре +4 °С до постановки реакции. Поскольку иммунный ответ при

большинстве инфекционных болезней развивается с 5-7-го дня, а максимальное нарастание титра антител происходит лишь в периоде реконвалесценции, серологические методы менее пригодны для ранней диагностики и используются главным образом в целях ретроспективной расшифровки этиологии уже перенесенного инфекционного заболевания. Однако кровь для серологических исследований берется и в первые дни болезни, что в дальнейшем дает возможность наблюдать за нарастанием титра антител в динамике заболевания. Повторные серологические исследования при бактериальных инфекциях производятся не раньше, чем через 5-7 дней. При вирусных заболеваниях берутся «парные сыворотки» с интервалом 10-12 дней и при нарастании титра антител в 4 раза и более подтверждается диагноз предполагаемого заболевания. Постановка реакции агглютинации классическим (пробирочным) методом. В качестве примера проведем постановку РА на бруцеллез с сывороткой крови крупного рогатого скота. Реакция ставится в объеме 1 мл жидкости. Разлив компонентов реакции проводят индивидуальными мерными пипетками; автоматическими пипетками Флоринского, одиночными или групповыми. Для исследования каждой испытуемой сыворотки крови требуется 5 пробирок, поставленных в первый ряд. Количество таких рядов зависит от числа исследуемых сывороток. В первой пробирке каждого ряда готовят основное разведение 1:25. Для этого к 2,4 мл физиологического раствора вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки. После приготовления основного разведения сывороток в остальные 4 пробирки, кроме 2-й, каждого ряда разливают по 0,5 мл физиологического раствора. Затем из первой пробирки из разведения 1:25 вносят 0,5 мл во вторую пробирку, получая разведение 1:50. Из этого разведения готовят разведение 1:100, перенося из одной пробирки 0,5 мл жидкости. Методом последовательного разведения готовят разведение 1:200 и 1:400. Из последней пробирки (1:400) излишок жидкости 0,5 мл удаляют (рис. 1) сбора избыточной жидкости; в - резиновая груша; г - пипетка-мерник. Во все пробирки, кроме первой, вносят по 0,5 мл антигена, разведенного 1:10

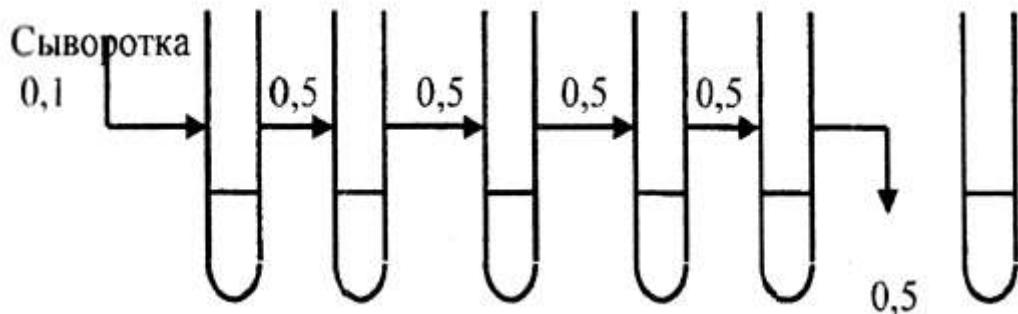


Рис. 1 Схема постановки реакции агглютинации пробирочным методом

Таким образом, получают ряд из четырех исследуемых пробирок с разведениями сыворотки 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 в объеме 0,5 мл. Во все пробирки каждого ряда, кроме первой (1:25), вносят по 0,5 мл антигена, предварительно разбавленного 1:10 физиологическим раствором. Первая пробирка с сывороткой в разведении 1:25 без антигена служит контролем качества сыворотки. При наличии хлопьев, фибрин, эритроцитов и посторонних примесей результаты агглютинации не учитываются. При постановке РА одновременно с исследуемыми сыворотками ставят контроля:

- с негативной (отрицательной) сывороткой в тех разведениях, как с исследуемыми;
- с позитивной (положительной) сывороткой в разведениях до ее предельного титра;
- контроль антигена (0,5 мл физиологического раствора с 0,5 мл разведенного антигена) для исключения спонтанной агглютинации. После розлива всех компонентов штативы с пробирками осторожно стряхивают и помещают в термостат при 37-38°C на 16-20 ч, затем выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч и проводят учет реакции. Результаты реакции учитывают визуально и определяют ее степень в плюсах по следующей схеме (рис. 2).

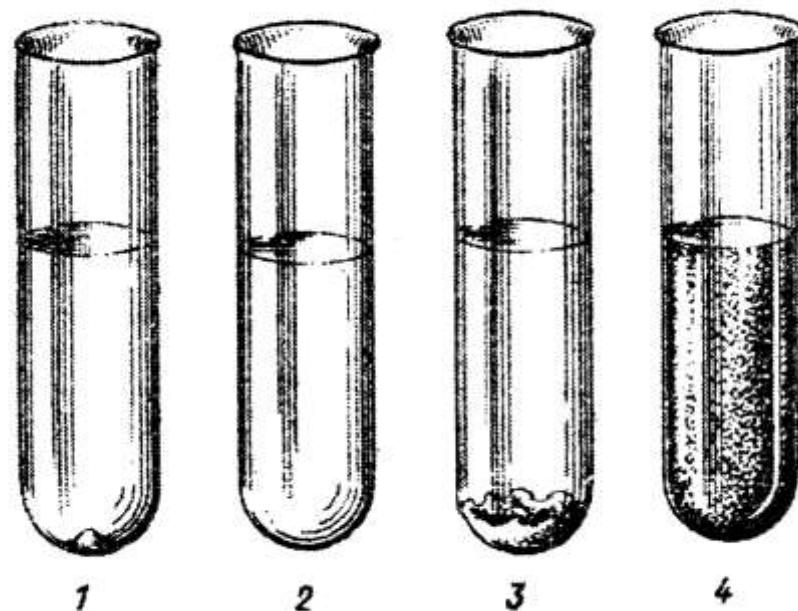


Рис. 2 Реакция агглютинации при постановке пробирочным методом: 1 и 2 отрицательные; 3 и 4 - положительные

(++) - полное просветление жидкости, на дне осадок в виде «зонтика», при легком встряхивании осадок разбивается на мелкие зерна, а жидкость остается прозрачной (100%-ная агглютинация);

(++) - неполное просветление жидкости, «зонтик» хорошо выражен, при встряхивании - мелкие зерна (75%-ная агглютинация);

(++) - незначительное просветление жидкости, «зонтик» умеренно выражен, при встряхивании мелкие зерна (50%-ная агглютинация);

(+) - едва заметное просветление жидкости, «зонтик» выражен слабо, при встряхивании заметно небольшое количество зерен (25%-ная агглютинация);

(-) - просветление жидкости, образования «зонтика» не наступило, на дне пробирки видна «пуговка» осевших микробов, при легком встряхивании образуется равномерная взвесь.

За титр антител принимают последнее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация не менее чем на два плюса (++)

Реакцию считают положительной при наличии агглютинации с сывороткой крупного рогатого скота с оценкой не менее чем два плюса (++) в разведении 1:100 и выше.