

**Министерство здравоохранения Украины
Запорожский государственный медицинский университет
Кафедра клинической лабораторной диагностики**

Лабораторная служба и оценка аналитических методов

Рабочая тетрадь

**для студентов медицинского факультета специальности:
«Лабораторная диагностика» и
иностраннх студентов фармацевтического факультета
специальности: «Фармация»**

Студент _____

Группы № _____

**г. Запорожье
2016 г.**

Авторы: Павлов С.В., Горбачева С.В., Беленький С.А., Евсева Л.В., Левченко Е.В., Сидоренко О.О.

Под общей редакцией Павлова С.В.

Рабочая тетрадь составлена согласно учебному плану Министерства здравоохранения Украины для студентов медицинских факультетов медицинских ВУЗов специальности «Лабораторная диагностика».

В рабочей тетради представлен материал в соответствие с современным представлением о клинической лабораторной службе. В пособие включены элементы доказательной лабораторной медицины, наиболее ярко отражающий практический потенциал современной клинической лабораторной диагностики. К каждому занятию даны вопросы для подготовки, а также задания для самостоятельной работы.

Рабочая тетрадь предназначена для студентов медицинского факультета, специальности «Лабораторная диагностика».

Рецензенты:

Рабочая тетрадь утверждена центральным методическим Советом ЗГМУ
(протокол № _____ от _____ 20__ г.)

Содержание:

МОДУЛЬ 1

Лабораторная служба.

ЗАНЯТИЕ № 1

Клиническая лабораторная аналитика. Лексикон клинической лабораторной аналитики.

ЗАНЯТИЕ № 2

Организация рабочего места в лаборатории. Лабораторные реагенты

ЗАНЯТИЕ № 3

Методы разделения компонентов биоматериалов

ЗАНЯТИЕ № 4

Физико-химические методы детекции и количественного определения компонентов биоматериалов. Оптические и флуориметрические методы.

ЗАНЯТИЕ № 5

Физико-химические методы детекции и количественного определения компонентов биоматериалов. Нефелометрические и электрохимические методы. Масс-спектрометрия.

ЗАНЯТИЕ № 6

Физико-химические методы детекции и количественного определения компонентов биоматериалов, основанные на биологических закономерностях.

ЗАНЯТИЕ № 7

Основные методы исследования клеток в клинической лабораторной аналитике

МОДУЛЬ 2

Оценка аналитических методов

ЗАНЯТИЕ № 8

Техническое оснащение современной клинической лаборатории.

ЗАНЯТИЕ № 9

Управление качеством клинических лабораторных исследований.

ЗАНЯТИЕ № 10

Основные требования к методам в клинической лабораторной аналитике.

ЗАНЯТИЕ № 11

Статистические методы в клинической лабораторной аналитике.

ЗАНЯТИЕ № 12

Итоговое занятие.

МОДУЛЬ 1
Лабораторная служба
ЗАНЯТИЕ № 1

Клиническая лабораторная аналитика. Лексикон клинической лабораторной аналитики.

Контрольные вопросы по данной теме

1. Клиническая лабораторная аналитика.
2. Лексикон клинической лабораторной аналитики.
3. Доказательная лабораторная медицина
4. Техника безопасности работы в лаборатории

По определению Всемирной Организации Здравоохранения качество медицинской помощи населению – это мера соответствия оказываемой медицинской помощи (диагностической, лечебной) уровню медицинской науки и новых технологий.

Доказательная медицина в отношении клинической практики – это направление или технология сбора, анализа, получения, обобщения и интерпретации информации о методах обследования и лечения пациента.

Главный принцип доказательной медицины состоит в том, что каждая технологическая операция, каждое клиническое решение должно базироваться на строго доказанных научных фактах.

Доказательная лабораторная медицина означает использование современных достижений для обследования каждого пациента, а при производстве лабораторных анализов- это неукоснительное соблюдение требований международных, отечественных и национальных стандартов.

Наиболее важными международными стандартами лабораторной медицины являются:

- ISO 9001:2000 -Требования к системам качества
- ISO 15189 -Требования к медицинским лабораториям
- ISO 15190 - Требования к безопасности медицинских лабораторий
- ISO 15193 - Требования к диагностическим системам *in vitro*
- ISO 15194 - Медицинские изделия для диагностики *in vitro*»
- ISO 15195 - Требования к референтным лабораториям
- ISO 17511: 2002 - Требования к калибраторам и к контрольным материалам

В настоящее время особую актуальность приобретает вопрос экспресс-диагностики вне лаборатории, т.е. анализы по месту лечения, у постели пациента (международный термин- АМЛ).

Основные зоны источников ошибочных результатов лабораторных анализов:

1. Сфера получения биоматериала и использование результатов лабораторных анализов.
2. Сфера выполнения лабораторных анализов (адекватность средств и технологий анализа, соблюдение правил контроля качества исследований, навыки и умение персонала лабораторий)

3. Сфера производства средств анализа (химических и биологических реагентов, тест-систем и др.- условия их производства и хранения).

Основные положения доказательной лабораторной медицины включают использование объективных, научно обоснованных критериев по всем аспектам деятельности лабораторий:

1. На преаналитическом этапе (оптимальный набор лабораторных тестов, оптимальная программа, технологическая карта пациента, соблюдение технологии взятия, сбора и доставки биоматериала)

2. На аналитическом этапе (индустриальный подход к повышению качества анализов и неукоснительное соблюдение требований международных и отечественных стандартов при проведении лабораторных исследований)

3. На постаналитическом этапе (правильная оценка-интерпретация и эффективное использование результатов лабораторных анализов).

Техника безопасности работы в лаборатории

Задания по аудиторной работе

1. Дайте определение доказательной медицине? Ее основные положения.

2. Напишите основные цели лабораторной медицины.

3. Сфера применения результатов лабораторных исследований?

4. Напишите круг действий в процессе клинического лабораторного исследования:

5. Зачем нужна стандартизация?

6. Международные стандарты используемые в лабораторной медицине?

№ стандарта	Название стандарта

7. Какие основные зоны источников ошибочных результатов лабораторных анализов, вы знаете?

8. Напишите различия, между: величина должная, величина (измеряемая), величина истинная, величина наиболее вероятная, величина ожидаемая, величина указанная (установленная), величина холостой пробы (смеси), внешняя оценка качества

9. Заполните таблицу

Вариация					факторы
аналитическая	биологическая	патологическая	преданалитическая	ятрогенная	

10. Дайте определения понятиям:

Анализ

Антиген

Антитело

Аудит качества

Воспроизводимость аналитического

Воспроизводимость измерений

Гравиметрический метод

Диапазон измерений

Измерение

Иммуноген

Квалиметрия

Компонент анализируемый (аналит)

Метод измерения (принцип)

Методика измерений (процедура)

Надежность аналитическая

Обнаружение (наблюдение)

Образец биологического материала (жидкости)

Объект исследования (в клинической лаборатории) -

ЗАНЯТИЕ № 2

Организация рабочего места в лаборатории. Лабораторные реагенты

Контрольные вопросы

1. Устройство и оборудование лаборатории
2. Требования к организации рабочего места
3. По каким признакам классифицируются химические реактивы
4. Требования к качеству химических реактивов.
5. Растворы применяемые в клинической лаборатории.
6. Что такое буферные растворы.
7. Контроль качества исходных материалов
8. Основные требования к наборам реактивов

Устройство и оборудование лаборатории

Название «лаборатория» происходит от латинского слова «laborare», что означает в переводе на русский язык работать, обрабатывать.

Различают лаборатории клинико-диагностические и специализированные (бактериологические, иммунологические, вирусологические, серологические, токсикологические, цитологические и гистологические, цитогенетические и др.).

Задачи, стоящие перед различными лабораториями, могут быть разными, но принципы организации, оборудования и работы в них остаются общими для всех лабораторий.

Требования к помещениям. Под клинико-диагностическую лабораторию следует отводить просторное светлое помещение, обязательно обеспеченное водопроводом, канализацией и электричеством. Отопление предпочтительнее центральное. Желательно, чтобы лаборатории были газифицированы и снабжены установками для получения дистиллированной воды.

Если помещение лаборатории расположено в цокольных или полуподвальных помещениях, то рабочие места необходимо обеспечить хорошим освещением, желательно лампами дневного света. Освещенность рабочих мест должна быть не ниже 60 люкс.

Площадь лабораторных помещений должна обеспечивать среднюю санитарную норму на каждого работающего, в среднем 12-14 м².

Недопустимо скопление в лаборатории большого числа работающих.

Электрическое энергоснабжение должно обеспечивать питание всей измерительной и вспомогательной аппаратуры лаборатории. Необходимо предусмотреть достаточное количество электророзеток различных типов, электросиловых автоматов и обязательно систему заземления электрооборудования. Лаборатория должна быть оборудована приточно-вытяжной вентиляцией с мощностью не менее 3-кратного обмена воздуха в помещении за смену. Кроме того, все работы с мокротой и калом, а также с газообразными, летучими и ядовитыми веществами необходимо проводить в вытяжном шкафу. Вытяжные шкафы бывают различными по конструкции. Вытяжная система шкафа состоит из побудительного вентилятора и воздуховодов, которые имеют либо самостоятельный выход на улицу подальше от рабочих помещений и палат для больных, либо же, что еще лучше, в домах старой постройки открываются в дымоход.

Для поддержания оптимальной температуры воздуха в рабочем помещении в жаркое время года необходимо предусмотреть в лаборатории установку кондиционеров.

Лабораторная мебель. В лаборатории не должно быть много мебели, но рабочие химические столы должны быть большие, приблизительно от 1,5 до 3 м² полезной поверхности на каждого работающего (длина не менее 1,5 м² при ширине от 60 до 90 см). Это необходимо для того, чтобы удобно было расставить исследуемый материал, реактивы и посуду. Столы следует располагать таким образом, чтобы свет падал сбоку, желательно с левой

стороны от работающего. Столешницы выпускаемых современных химических столов обычно имеют химически стойкое декоративное покрытие. Если же в качестве покрытия используется линолеум, то его необходимо обработать каким-либо кислотоупорным составом. Например, пастой, содержащей следующие ингредиенты: воска — 10 г, церезина — 20 г, скипидара — 1 г, бензина — 80 г. Пасту наносят на линолеум тонким слоем, и после высыхания растирают жесткой щеткой.

Стеклянные пипетки лучше выставлять в пробирки в обычных лабораторных штативах, каждая пипетка должна быть подписана для соответствующего реактива и размечена под необходимые объемы стеклографом. Механические автоматические пипетки и наконечники к ним хранятся в специальных штативах. На рабочем столе следует установить также емкость для дистиллированной воды, сосуды для промывания пипеток и емкости с дезинфицирующими растворами для обработки столов и рук персонала. Около каждого химического стола надо иметь специальные склянки для слива отработанного материала и ящики для использованной посуды.

В лаборатории необходимо иметь письменные столы, где выполняются расчеты, выписки и регистрация результатов анализа. Там же хранятся журналы регистрации, справочная литература. Лаборатория должна быть укомплектована специальными шкафами для хранения реактивов и стеклянной посуды, а также сейфом для сильнодействующих и ядовитых веществ. Стулья лучше подходят типа вертушки с моющимся покрытием. В лаборатории необходимо установить аппарат для дистилляции воды, который лучше расположить в моечной.

Весоизмерительная техника.

Если нет возможности оборудовать отдельную комнату, должна быть установлена в местах, отдаленных от всякого рода отопительных и нагревательных приборов, исключаются также места возможных сквозняков и действия едких испарений реактивов. С особой тщательностью эти условия должны быть соблюдены при выборе места для установки аналитических весов. Для установки аналитических весов следует иметь специальные комнаты или боксы. Перед каждыми весами необходимо иметь осветители.

Фотометрическую аппаратуру также предпочтительнее концентрировать в отдельной комнате — аппаратной или же на столе, где не выполняются основные рабочие манипуляции.

В лаборатории следует обязательно иметь в наличии самые необходимые справочные книги, пособия или учебные руководства для получения срочной справки по ходу выполняемой работы.

Все КДЛ должны иметь специальное оборудование, приборы и инструменты. Желательно, чтобы в каждой лаборатории были аналитические и аптечные весы, штативы, подставки, центрифуги, сушильный шкаф, термостаты, автоклав, стерилизаторы, различные специальные приборы, микроскопы, электроколориметры, реактивы, красители, а также набор необходимой лабораторной посуды; предметные и покровные стекла, чашки

Петри, пробирки, пипетки, воронки, колбы, химические стаканчики, ступки, мензурки, цилиндры, бюретки, склянки, банки и др.

Медицинский работник в своей деятельности использует знания основ лабораторного дела, методов исследования биологического материала, элементов крови на всех этапах развития. Специалист пользуется навыками методов приготовления реактивов и растворов, правилами дезинфекции применённых в работе инструментов.

Требования к организации рабочего места.

1. Лаборатория должна быть оснащена современной лабораторной мебелью, вытяжными шкафами. Для реактивов выделяют отдельные полки и шкафы.

2. Поверхность производственных столов для работы с биологическим материалом должна быть из водонепроницаемого, кислото-щёлочестойчивого и индифферентного к действию дезинфектантов материала. Лабораторный стол следует содержать в порядке и чистоте.

3. Рабочее место должно быть хорошо освещено: недалеко от окон и иметь осветительные лампы.

4. Рабочий стол лаб-рии должен быть приспособлен к условиям работы, оборудован водопроводными кранами и водостоком.

Лабораторные реагенты

В клинических лабораторных исследованиях используется широкий ассортимент различных химических реактивов, биологических препаратов, природных и синтетических веществ, от качества которых и соответствия их поставленным исследователем задачам зависит получение воспроизводимых, контролируемых, статистически достоверных и сравнимых результатов.

Задания по аудиторной работе

1. Напишите основные требования к помещениям.

2. Напишите основные способы выражения концентрации:

3. Какие этапы включает в себя окончательный контроль качества

4. Для химических и биологических материалов этикетка должна содержать следующие сведения:

5. Содержание инструкции к набору

6. Напишите основные требования к качеству реактивов

7. Напишите классификацию реактивов.

ЗАНЯТИЕ № 3

Методы разделения компонентов биоматериалов.

Контрольные вопросы

1. Какие методы разделения веществ вы знаете. На каких физико-химических свойствах они основаны.
2. Виды центрифугирования вы знаете.
3. Способы фильтрования веществ.
4. Назовите виды электрофореза, в чем особенность каждого из методов.

В КДЛ используются различные методы разделения компонентов биологического материала. К методам разделения относятся: экстрагирование, фильтрование, центрифугирование, электрофорез, хроматография.

Электрофорез - метод разделения заряженных частиц при движении их в растворе под действием внешнего электрического поля. Метод основан

на свойстве ионизированных, т.е. несущих заряд, молекул двигаться к электродам.

В растворе более кислом, чем изоэлектрическая точка растворенного вещества, амфолит способен приобретать положительный или отрицательный заряд. Связывая протоны, вещество становится заряженным положительно и движется к отрицательно заряженному катоду; при потере протонов, приобретая отрицательный заряд, молекула движется к положительно заряженному аноду.

Процедура электрофореза состоит в том, что гидратированный поддерживающий материал помещается в электрофоретическую камеру, содержащую буферный раствор. Избыток буферного раствора должен быть удалён. Проба наносится на поддерживающий материал. Устанавливается требуемая постоянная сила тока и напряжение. Процесс разделения протекает на определенный промежуток времени. Поддерживающий материал вынимают из камеры и быстро высушивают или помещают в закрепитель для предупреждения диффузии компонентов пробы. Зафиксированный поддерживающий материал окрашивают, чтобы выявить зоны отдельных белков. После удаления из белка избытка красителя поддерживающий материал высушивают или обрабатывают просветляющим реагентом.

Электрофоретическая подвижность молекулы прямо пропорционально её заряду и обратно пропорциональна размеру частицы и вязкости раствора (электрофоретического буфера).

После разделения фракций белков сыворотки крови должна следовать их идентификация и количественная оценка. Идентификация осуществляется по положению зон относительно места старта или по сопоставлению с параллельно разгоняемой пробой со стандартным образцом.

При электрофорезе белков сыворотке крови проба обычно делится на 5 фракций: альбумины, α_1 -глобулины, α_2 -глобулины, β -глобулины и γ -глобулины.

Количественная оценка фракций белков осуществляется с помощью прямой денситометрии или путем фотометрии элюатов отдельных полосок электрофореграммы.

Денситометрия состоит в сканировании просветленных, окрашенных и зафиксированных полосок носителя. Результаты выражаются в графической форме череды пиков и в цифровой форме процентных соотношений белковых фракций (для этого используются **денситометры**).

Хроматография -это совокупность методов разделения и анализа смесей веществ, основанных на различном распределении компонентов между подвижной (газ или жидкость) и неподвижной (жидкость, твёрдый сорбент или их смесь) фазами хроматографической системы.

В настоящее время используются различные **виды хроматографии**: бумажная, жидкостная, газовая, тонкослойная, ионообменная и др. виды.

В основе механизма поверхностно-адсорбционной хроматографии лежат электростатические, водородные и дисперсионные взаимодействия. В

газовой хроматографии осуществляется анализ низкомолекулярных веществ (метилового, этилового, изопропилового спиртов, а также таких газов, как кислород, азот, углекислый газ) с помощью так называемых «молекулярных сит».

В жидкостном варианте хроматографии используется три типа адсорбентов.

В ионообменной хроматографии отделение искомого вещества из исследуемой пробы, содержащей смесь, происходит на основе различий знака и величины ионного заряда неорганических ионов, аминокислот, белков, нуклеотидов.

Бумажная хроматография основана на использовании в качестве стационарной фазы различных сортов фильтровальной бумаги.

В тонкослойной хроматографии носителем является тонкий слой сорбента (силикагель, микроцеллюлоза, алюминий, сефадекс и др.), нанесенный на стеклянную или пластиковую пластинку.

Наиболее популярным вариантом жидкостной хроматографии в лабораторной аналитике является так называемая высокопроизводительная жидкостная хроматография (ВПЖХ), выполняемая в жидкостных хроматографах.

Задания по аудиторной работе

1. Дайте определение понятиям:

Экстрагирование

Фильтрование

Центрифугирование

Электрофорез

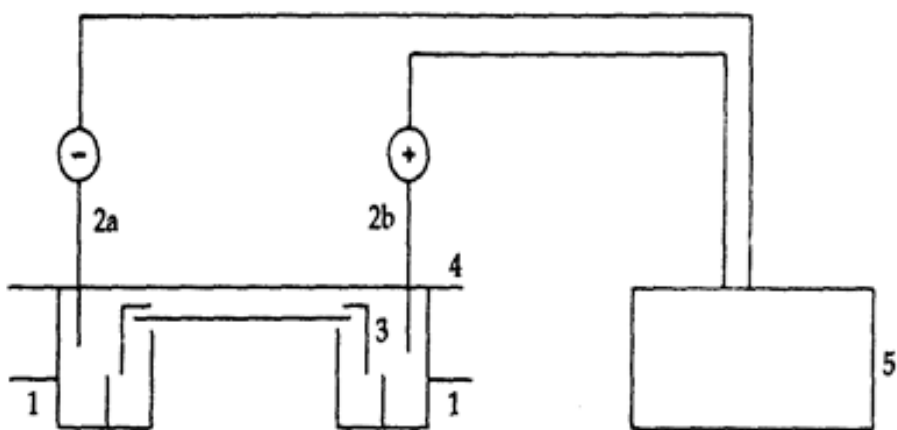
Хроматография

2. Напишите виды электрофореза:

3. Заполните таблицу

Виды хроматографии	Характеристика хроматографии

4. Подпишите названия элементов схемы устройства аппарата для электрофореза



1-

2a-

2b-

3-

4-

5-

5. Центрифугирование в градиенте плотности –

ЗАНЯТИЕ № 4

Физико-химические методы детекции и количественного определения компонентов биоматериалов. Оптические и флуориметрические методы.

Контрольные вопросы

1. Опишите природу света. Спектр солнечного света.
2. Фотометрические и спектрофотометрические методы, основные положения.
3. Устройство фотометрических приборов.
4. Методы измерений оптической плотности.
5. Расчет точности измерения оптической плотности.

6. Стандартизация фотометрических приборов.

7. Флюорометрические методы.

Оптический количественный анализ основывается на регистрации изменений, происходящих с лучом света при прохождении его через исследуемый раствор, а именно: интенсивности поглощения – абсорбционная фотометрия; свечения молекул и атомов вещества – флюориметрия, пламенная фотометрия; величины отклонения монохроматического светового потока от первоначального направления его распространения-рефрактометрия; изменения угла вращения плоскополяризованного света – поляриметрия.

В соответствии с этим оптические методы количественного анализа подразделяются на: 1) рефрактометрию, 2) поляриметрию, 3) фотометрию. Различают следующие **виды фотометрического анализа**:

а) абсорбционная фотометрия:

- спектрофотометрия
- нефелометрия
- атомно-абсорбционная фотометрия

б) эмиссионная фотометрия:

- флюориметрия
- пламенная фотометрия
- атомно-эмиссионный спектральный анализ.

Рефрактометрия основана на измерении показателя преломления света при прохождении его через оптически неоднородные среды.

Абсорбционный анализ основан на физическом свойстве веществ, избирательно поглощать монохроматический поток световой энергии. При помощи его можно измерять «светопоглощение» раствора или интенсивность окраски, которая непосредственно связана с концентрацией вещества в растворе.

Фотометрия – измерение количества поглощенного света, независимо от длины волны. В клинической лабораторной диагностике практически используются только узкие полосы – определенные диапазоны длин волн, выделенные при помощи светофильтров или с помощью определенных более сложных устройств – призм или решеток или их комбинаций (**спектрофотометры**).

При проведении фотометрических исследований оценку результатов чаще всего производят тремя способами:

- **по конечной точке** (измерение в конечной точке);
- **по фиксированному времени** (измерение через определенное время)
- **кинетически** (измерение в динамике).

Определение по конечной точке состоит в учете образования конечного продукта за время инкубации. Как правило, производится автоматически по стандартным программам используемых анализаторов.

Кинетический метод исследования, как правило, является ферментативным. Он выполняется при условии выделения строго

монохроматизированного светового потока (благодаря применению фотометров с интерференционными светофильтрами или спектрофотометров) с использованием термостатируемой кюветы (чаще всего при температуре 37°C). После старта реакции через определенный интервал времени (например, 60сек.) находят изменение оптической плотности. Из полученных значений рассчитывают среднюю величину изменения абсорбции (Δ) и с использованием определенных коэффициентов производят расчет с выражением результатов в ЕД/л (кат/л) и их производных.

В настоящее время в КДЛ широко используются несколько **типов биохимических анализаторов**:

1. Одноцелевые биохимические анализаторы (моноанализаторы), с помощью которых в анализируемой пробе определяется лишь один биохимический компонент биологической жидкости. К ним могут быть отнесены, например, анализатор для определения уровня глюкозы в сыворотке, для определения содержания кальция и т.д.

2. Анализаторы для определения так называемых родственных компонентов. Это, например, автоанализатор аминокислот, принцип действия которого основан на их хроматографическом разделении, автоматический атомно-абсорбционный спектрофотометр и др..

3. Многоцелевые биохимические анализаторы (полианализаторы), предназначенные для определения содержания в биологических жидкостях большого количества различных по химической природе компонентов. Эти полианализаторы широко используются в биохимических лабораториях ЛПУ Республики Казахстан и в других странах.

Всем **биохимическим автоанализаторам свойственны**:

1) программное обеспечение, достигаемое использованием современной компьютерной техники.

2) осуществление контроля над работой отдельных блоков прибора и контроля качества проводимых лабораторных исследований (в соответствии с заложенной компьютерной программой);

3) автоматическая пробоподготовка и дозирование.

К **основным преимуществам автоматизированных устройств относятся**:

- Экономичность (экономное расходование реагентов). Если при работе на ФЭКе обычно требуется 3-4 мл реактива, то при выполнении исследований на автоанализаторе всего лишь 350-500 мкл (и менее). Отсюда возможность 10-кратной экономии реагентов.

- Использование небольшого количества анализируемой биологической жидкости (3-7 мкл).

- Высокая производительность (до 800 и более исследований в час):

- Достаточно большая загруженность. Автоанализатор должен эксплуатироваться не менее 5-6 часов в сутки.

- Гибкость в работе. Обеспечивается возможностью выполнения разных режимов определения: по конечной точке, двух- и многоточечной

кинетики, с привлечением технологии турбидиметрии (иммунонефелометрии), ионометрии, поляризационной флюориметрии и др.

В настоящее время широко используется принцип турбидиметрии с фиксированной абсорбцией. Особенностью этого технологического процесса является измерение времени прироста оптической плотности до заданного ее значения. Этот принцип реализуется в коагулологии.

- Возможность программирования автоанализатора под реактивы разных фирм-производителей, так называемая «открытость» системы, которая предполагает введение в компьютер всех необходимых компонентов биохимической реакции и осуществление самостоятельного программирования. Открытость системы имеет большое значение, так как стоимость одного биохимического исследования на 50% определяется используемыми реагентами, на 30%-стоимостью анализатора и на 20% - всеми остальными затратами.

- Применение небольших (в том числе и моющихся) измерительных кювет.

- Системный подход, который расценивается как возможность «просмотреть» ход реакции, что позволяет, в частности, выявить фазу использования субстрата и кофакторов.

- Программное сохранение базы данных.

- Возможность выполнения экстренных исследований.

- Связь с компьютерами: многие автоанализаторы в КДЛ имеют выход на центральный компьютер (в КДЛ, ЛПУ, централизованная, референс-лаборатории и др.).

- Широкие возможности измерительного модуля. В отличие от обычных фотоэлектроколориметров, позволяющих измерять оптическую плотность растворов в пределах до 0,2-0,7 ед., современные биохимические автоанализаторы дают возможность регистрировать абсорбцию (при условии соблюдения закона Бугера – Ламберта - Беера) в диапазоне до 2,5 ед. Это достигается использованием мощного источника облучения и более чувствительных приемников света.

Использование неагрессивных жидкостей. Ферментные наборы реагентов не содержат агрессивных компонентов, поэтому они практически не обладают токсическим эффектом.

- Надежность устройства, связанная с применением новейших технологий.

Задания по аудиторной работе

1. Опишите природу света.

2. Заполните таблицу «Спектр солнечного света»

Длина волны	Название диапазона	Воспринимаемый глазом цвет

3. Закон Ламберта-Бера -

4. Напишите основные преимущества автоматизированных устройств.

5. Нарисуйте схему устройства анализатора поляризации флюоресценции.

6. Принцип работы спектрофотометра

7. Нарисуйте схему однолучевого спектрофотометра.

8. Какие типы биохимических анализаторов используются в КДЛ.

9. Сравнительная характеристика немедленной флюоресценции и флюорометрии с разрешением во времени.

10. Дайте определение следующим дефинициям:
Спектрофотометри-

Фотометрия-

Колориметрия-

11. Стандартизация фотометрических приборов в лаборатории.

ЗАНЯТИЕ № 5

Физико-химические методы детекции и количественного определения компонентов биоматериалов. Нефелометрические и электрохимические методы. Масс-спектрометрия.

Контрольные вопросы

1. Нефелометрические методы анализа. Их преимущества.
2. Эмиссионные спектральные методы.
3. Атомная абсорбционная спектроскопия (ААС).
4. Электрохимические методы исследования.
5. Масс-спектрометрия, принцип метода

Нефелометрия основана на том, что *определяемый компонент переводят в малорастворимое соединение*, которое находится в растворе в виде взвешенных частиц. При нефелометрии измеряют *интенсивность света, рассеянного этими частицами*; в котором находятся взвешенные частицы. При измерение интенсивности рассеянного или прошедшего через раствор света позволяет судить о концентрации частиц в растворе. В нефелометрии используются реакции осаждения, к которым предъявляются

следующие требования: продукт реакции должен быть практически нерастворимым и находится в виде взвешенных частиц (суспензии). Взвешенные частицы существуют в растворе длительное время. Условия приготовления суспензий стандартных и анализируемых растворов должны быть одинаковыми.

Для измерения интенсивности рассеянного света пользуются специальными приборами - нефелометрами, которые по конструкции близки к фотокolorиметрам.

Основным достоинством нефелометрии является ее высокая чувствительность, что особенно ценно по отношению к элементам или ионам, для которых отсутствуют цветные реакции и не разработаны фотокolorиметрические методы.

К электрохимическим относятся следующие методы:

1. **Электрогравиметрический анализ** - выделение из раствора электролитов веществ, осаждающихся на электродах при прохождении через раствор постоянного электрического тока.

Разновидностью электрогравиметрического анализа является метод внутреннего электролиза, основанный на использовании электрического тока, возникающего при погружении в анализируемый раствор двух электродов, составляющих гальваническую пару. На электродах выделяется вещество, по массе осадка судят о содержании этого вещества в растворе;

2. **кондуктометрия** - измерение электропроводности анализируемых растворов, изменяющейся в результате химических реакций и зависящей от свойств электролита, его температуры и концентрации растворенного вещества;

3. **потенциометрия** - измерение изменяющегося в результате химической реакции потенциала электрода, погруженного в анализируемый раствор. Величина потенциала зависит от концентрации ионов в растворе при других постоянных условиях измерения;

4. **вольтамперометрия** - измерение силы тока изменяющейся в зависимости от напряжения в процессе электролиза, в условиях, когда один из электродов имеет очень малую поверхность. При полярографических измерениях таким электродом является капли ртути, вытекающие из очень тонкого отверстия капиллярной трубки, а также платиновый, графитовый, серебряный и др. электроды;

5. **кулонометрия** - измерение количества электричества, израсходованного на электролиз определенного количества вещества.

Спектральные методы

Спектральные методы основаны на изучении спектров излучения, поглощения и рассеивания. К этой группе относятся:

1. **эмиссионный спектральный анализ** - изучение эмиссионных спектров элементов анализируемого вещества. Этот метод позволяет определить элементарный состав вещества;

2. **абсорбционный спектральный анализ** - изучение спектров поглощения исследуемого вещества. Различают исследования в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях спектра.

Абсорбционный спектральный анализ включает методы:

- спектрофотометрический;
- колориметрический.

Спектрофотометрия - определение спектра поглощения или измерения светопоглощения при строго определенной длине волны, которая соответствует максимуму кривой поглощения данного исследуемого вещества.

Колориметрия - сравнение интенсивности окрасок исследуемого окрашенного раствора и стандартного окрашенного раствора строго определенной концентрации.

К оптическим методам анализа также относятся

3. **турбидиметрия** - измерение количества света, поглощаемого неокрашенной суспензией;

4. **нефелометрия** - использование явлений отражения или рассеивания света окрашенными или неокрашенными частицами взвешенного в растворе осадка;

5. **люминисцентный, или флуоресцентный анализ** - основанный на флуоресценции веществ, облученных ультрафиолетовым светом, и измерении интенсивности излучаемого или видимого света;

6. **фотометрия пламени** - распыление анализируемого раствора в пламени, выделение характерной для данного элемента световой волны и измерение интенсивности излучения.

Хроматографические методы

Хроматографические методы относятся к гибридным или комбинированным. Это означает, что они основаны на комбинировании, как минимум, двух разнородных принципов принципа предварительного разделения веществ и принципа последующего детектирования (определения) каждого из них по очереди.

Таким образом, хроматограф всегда состоит из двух блоков - блока разделения и блока детектирования.

В соответствии с тремя типами систем и существующих в них распределений: газ - твердая фаза, жидкость - твердая фаза (абсорбция), жидкость - жидкость (экстракция).

Газовая хроматография - метод разделения летучих соединений, основанный на распределении вещества между двумя фазами, одна из которых является неподвижной с большой поверхностью, а другая - газ, протекающий через неподвижную фазу.

Если неподвижная фаза твердая, то мы говорим о газоадсорбционной хроматографии.

Если неподвижная фаза - жидкость, то мы говорим о газожидкостной хроматографии (ГЖХ).

Явление экстракции (жидкость - жидкость) называется жидкостной хроматографией (ЖХ).

Радиометрические методы

Основаны на измерении излучений испускаемых радиоактивными элементами и отличаются очень высокой чувствительностью.

Метод радиоактивных индикаторов основан на предположении, что радиоактивный и стабильный изотопы химически идентичны и находятся в состоянии идеально однородного распределения.

Масс - спектрометрические методы (масс спектрометрия)

Они основаны на определении отдельных ионизированных атомов, молекул и радикалов посредством разделения потоков ионов, содержащих частицы с разным отношением массы к заряду в результате комбинированного действия электрического и магнитного полей.

Радиоспектроскопические

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) основан на явлении резонансного поглощения электромагнитных волн в постоянном магнитном поле.

Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Основан на использовании резонансного поглощения электромагнитных волн в постоянном магнитном поле, обусловленного ядерным магнетизмом.

Задания по аудиторной работе

1. Напишите классификацию электрохимических методов.

2. Какие электроды используются в полярографии.

3. Что такое масс-спектрометрия, принцип метода.

4. Дайте определение понятиям:
кондуктометрия –

потенциометрия –

вольтамперометрия-

кулонометрия -

5. Для чего применяется клинической лабораторной диагностике нефелометрия ?

6. Дайте характеристику эмиссионно спектральным методам.

7. Нарисуйте схему устройства пламенного фотометра.

8. Радиометрия. Охарактеризуйте этот метод анализа.

ЗАНЯТИЕ № 6

Физико-химические методы детекции и количественного определения компонентов биоматериалов, основанные на биологических закономерностях.

Контрольные вопросы

1. Особенности строения ферментов как белковых катализаторов.
2. Виды специфичности ферментов.
3. Основы классификации ферментов, классы ферментов, примеры катализируемых ферментами реакций.
4. Строение коферментов и кофакторов и их роль в ферментативном катализе, роль витаминов в этом процессе.
5. Основы ферментативной кинетики.
6. Единицы активности ферментов и способы их определения.

1. Ферменты - это белковые катализаторы, ускоряющие химические реакции в живых клетках. Они обладают всеми свойствами, характерными для белков, и определенными особенностями строения, обуславливающими их каталитические свойства. Ферменты, кроме того, подчиняются общим законам катализа и обладают свойствами, характерными для небиологических катализаторов: ускоряют энергетически возможные реакции, сохраняют энергию химической системы постоянной, не расходуются в процессе реакции.

2. Для ферментов характерны:

- **специфичность.** Биологическая функция фермента, как и любого белка, обусловлена наличием в его структуре активного центра, с которым взаимодействует определенный лиганд. Лиганд, взаимодействующий с активным центром фермента, называется **субстратом**.

- **каталитическая эффективность.** Большинство катализируемых ферментами реакций высокоэффективны, они протекают в 10^8 - 10^{14} раз быстрее, чем некатализируемые реакции. Каждая молекула фермента способна за секунду трансформировать от 100 до 1000 молекул субстрата в продукт.

- **конформационная лабильность.** Каталитическая эффективность фермента, как и любой белковой молекулы, зависит от его конформации и, в

частности, от конформации активного центра. В клетках имеются вещества, которые могут вызывать незначительные изменения конформации молекулы фермента за счет разрыва одних и образования других слабых связей; это может вызывать как повышение, так и снижение активности фермента.

3. Активность ферментов может регулироваться. Действие ферментов в клетке, как правило, строго упорядочено: продукт одной ферментативной реакции является субстратом другой; таким образом, образуются **метаболические пути**. Среди множества ферментов практически каждого метаболического пути имеются ключевые, или **регуляторные**, ферменты, активность которых может изменяться в зависимости от потребности клетки в конечном продукте метаболического пути.

4. Оптимальные условия протекания ферментативных реакций: температура 37-38 °С; нормальное атмосферное давление, рН 6,9-7,7, характерное для большинства тканей. В отличие от этого для эффективного химического катализа часто требуются высокие температура и давление, а также экстремальные значения рН.

Задания по аудиторной работе

1. Больная 35 лет обратилась в клинику с жалобами на воспалительные процессы слизистой оболочки ротовой полости, мышечную усталость, конъюнктивит. Больная в течение длительного времени питалась однообразно, исключая из своего рациона такие продукты, как печень, рожь, молоко, дрожжи. Врач диагностировал гиповитаминоз В₂. Объясните причины наблюдаемых симптомов. Для этого:

а) назовите коферменты, образующиеся из витамина В₂;

б) укажите, в каких реакциях участвуют данные коферменты;

в) напишите рабочие части формулы окисленной и восстановленной форм коферментов;

г) приведите примеры реакций с участием этих коферментов (используйте материалы учебника).

2. Применение ферментов в медицине

Применение	Название фермента	Примеры использования
Для диагностики		
Для терапии		

В качестве аналитических реактивов		
------------------------------------	--	--

3. На графике изобразите кривую уравнения Михаэлиса-Ментен: гиперболическая зависимость начальных скоростей катализируемой ферментом реакции от концентрации субстрата.

4. Дайте определение следующим понятиям:
Фермент –

Изофермент -

Активный центр -

Ферментативная реакция –

Активаторы ферментов

Ингибиторы ферментов

5. Заполните таблицу «Завершающие этапы ферментативных методов»

<i>Аналиты</i>	<i>Перекись водорода</i>	<i>НАД.Н</i>	<i>НАДФ.Н</i>
Аммиак			
Глюкоза			
Креатинин			
Молочная кислота			
Мочевая кислота			
Мочевина			

Неэстерифицированные			
жирные кислоты			
Пировиноградная кислота			
Триглицериды			
Фосфолипиды			
Холестерин			

6. Охарактеризуйте методы, основанные на специфическом связывании:

ЗАНЯТИЕ № 7

Основные методы исследования клеток в клинической лабораторной аналитики

Контрольные вопросы

1. Основные методы исследования клеток в клинической лабораторной аналитики.
2. Строение микроскопа.
3. Цитология и цитологические исследования.
4. Диагностика заболеваний цитологическими методами.

В клинко-диагностических лабораториях выполняются разнообразные исследования, основанные на визуальных наблюдениях лабораторных работников за клеточными или иными корпускулярными компонентами биоматериалов пациентов. Такая потребность возникает:

- при исследовании мочи, спинно-мозговой жидкости и других жидкостей организма;
- при подсчете клеток крови в счетных камерах;
- при дифференциальном подсчете лейкоцитов в мазках периферической крови;
- при исследовании клеток в мазках, соскобах, срезах тканей;
- при исследовании микроорганизмов, грибов, паразитов.

Для этих целей используются оптические приборы - микроскопы, позволяющие наблюдать увеличенное в десятки или сотни раз изображения изучаемых объектов.



Принципиальная схема оптической части микроскопа состоит из двух систем линз. Одна из них расположена в окуляре, т.е. устройстве для глаз

наблюдателя. Окуляр вставляется в тубус - трубку, по которой свет от наблюдаемого объекта проходит к глазу наблюдателя. Вторая система линз находится в непосредственной близости к изучаемому объекту и поэтому называется объективом. Различными конструкциями микроскопов предусмотрено наличие одного или двух окуляров (монокулярные или биноклярные микроскопы; последний вариант удобнее для наблюдателя, поскольку он имеет возможность наблюдать объект двумя глазами), нескольких сменных объективов, позволяющих подбирать желательные степени увеличения объекта. Объектив микроскопа выполняет функцию воспроизведения изображения наблюдаемого объекта с требуемым увеличением при разрешении элементов изображения, необходимом для их детального изучения, и при точном воспроизведении их по форме и цвету. Достижения современной оптики позволяют создавать такие оптические системы, которые отвечают самым строгим требованиям пользователей микроскопов.

Обычно лабораторные микроскопы имеют несколько объективов, расположенных на карусели в нижнем конце тубуса, что позволяет во время работы легко сменять объективы, подбирая нужное увеличение изображения. В зависимости от увеличения объективы имеют различные рабочие фокусные расстояния от препарата, так, объективы:

- с увеличением $\times 10$ имеют фокусное расстояние 15,98 мм;
- с увеличением $\times 40$ - 4,31 мм;
- с увеличением $\times 100$ - 1,81 мм (иммерсионный объектив).

Цитологическое исследование, основанное на изучении клеток, отличается относительной простотой и малой травматичностью, широко используется в диагностике заболеваний и, наряду с гистологическим, является полноценным методом морфологической верификации диагноза.

Цитологическая диагностика является одной из наиболее перспективных и быстро развивающихся дисциплин. Вместе с тем цитологическое исследование так же, как и другие диагностические методы, имеет определенные ограничения, которые могут зависеть от способа получения материала, локализации патологического очага, особенностей его гистологического строения, способности специалиста правильно идентифицировать клеточный состав препарата и интерпретировать картину. Они должны владеть методиками приготовления, фиксации и окрашивания препаратов, а также уметь провести микроскопическое исследование, первичный осмотр цитологических мазков, определять норму, неопухолевые поражения и выявлять более серьезные изменения в препаратах, дальнейшую дифференциальную диагностику по которым осуществляет врач.

Цитология – наука, изучающая общие черты строения и функционирования клеток и их производных. Она исследует отдельные клеточные структуры, их участие в общеклеточных физиологических процессах, пути регуляции этих процессов, воспроизведение клеток и их

компонентов, приспособление клеток к условиям среды, реакции на действие различных факторов, патологические изменения клеток. Клиническое цитологическое исследование – это оценка характеристик морфологической структуры клеточных элементов в цитологическом препарате (мазке) с целью установления диагноза доброкачественной или злокачественной опухоли и неопухолевых поражений. Оно основано на изучении с помощью микроскопа особенностей строения клеток, клеточного состава органов, тканей, жидкостей организма человека в норме и при патологических процессах. Отличие цитологического исследования от гистологического заключается в том, что изучаются не срезы тканей, а клетки; заключение основывается на особенностях изменения ядра, цитоплазмы, ядерно-цитоплазменного соотношения, образования структур и комплексов клеток.

Цитологический анализ используют при:

- Скрининге (профилактическом осмотре).
- Установлении (уточнении) диагноза при заболевании.
- Установлении (уточнении) диагноза во время операции.
- Контроле в ходе лечения и после лечения.
- Динамическом наблюдении (для раннего выявления рецидивов).

В практической исследовательской работе привлекают относительная простота, быстрота, легкая повторяемость. В нашей стране клиническая цитология является разделом лабораторной диагностики в связи с тем, что традиционно исследование клеточного состава входит в комплекс клинических лабораторных анализов – кровь, костный мозг, экссудаты, отделяемое различных органов. Однако методологически цитологическое исследование приближается к гистологическому, существенно отличаясь от всех других лабораторных методов.

Если ранняя клиническая цитология была представлена преимущественно эксфолиативной цитологией: исследование жидкостей – экссудаты, промывные воды; выделений – мокрота, моча; мазков из шейки матки, с поверхности опухоли, то в настоящее время преобладает пункционная цитология. В основном материал для исследования получают посредством пункции опухолевых образований тонкой иглой, пункции под контролем ультразвука, рентгена, компьютерной томографии. Значительную долю исследований в современной клинической цитологии составляют исследования мазков с кусочков, полученных при трепанобиопсии, мазков-отпечатков с операционного и биопсийного материала, мазков щеточкой и соскобов при эндоскопических исследованиях.

Основное назначение цитологического анализа – получить ответ на вопрос о наличии или отсутствии злокачественного новообразования (онкоцитология). В процессе дифференциальной диагностики определяется характер патологического процесса и устанавливаются воспалительные, реактивные, пролиферативные или предраковые поражения, а также доброкачественные опухоли. Роль морфологических исследований при диагностике опухолей неуклонно возрастает, так как детальная морфологическая характеристика новообразования позволяет более

обоснованно выбрать метод лечения (хирургическое, лучевое, химиотерапевтическое и их комбинацию), поскольку опухоли различного строения, происхождения и степени атипии клеток по-разному реагируют на лечение.

Цитологический анализ позволяет оценить характер и степень выраженности пролиферации эпителия, диагностировать предраковые состояния (дисплазии) и на этой основе формировать группы «повышенного риска». Цитологическое исследование позволяет осуществлять наблюдение непосредственно за характером клеточных изменений эпителия у лиц группы «повышенного риска», что фактически невозможно с помощью других морфологических методов.

Несравненные преимущества перед другими методами имеет цитологическое исследование в выявлении рака начальных стадий. Развитие эндоскопической техники, ультразвуковых методов исследования в немалой степени способствовало широкому внедрению цитологического анализа в диагностике новообразований практически из всех тканей организма, в том числе и из внутренних органов, ранее недоступных внеоперационному морфологическому анализу. Свидетельством этому является цитологическая диагностика рака желудка, легкого, мочевого пузыря и других органов при отсутствии клинических, рентгенологических и эндоскопических проявлений, еще до появления обнаруживаемых этими методами признаков. Такой высокий уровень диагностики позволяет использовать в работе принятые международные морфологические классификации, что чрезвычайно важно, более того, способствует разработке соответствующих цитологических классификаций. В настоящее время успехи в обеспечении здоровья населения во многом зависят от проведения массовых профилактических осмотров и, в первую очередь, групп с повышенным риском различных заболеваний, особенно злокачественных новообразований. Проведение эффективных массовых профилактических осмотров, как показывает наш опыт и опыт многих стран, невозможно без использования цитологического метода, получившего полное признание и широкое распространение.

Ранняя и своевременная диагностика опухолей организационно складывается из двух этапов:

1. Массовое обследование населения (скрининг всей популяции или только групп повышенного риска) для выявления опухолей или признаков, не позволяющих исключить опухоль.

2. Уточняющая диагностика в отобранных во время скрининга случаях, в сравнительно небольших группах.

На 1-м этапе основным требованием к цитологическому исследованию как скрининг-тесту является высокая чувствительность (т.е. высокая частота обнаружения клеток опухоли у больных со злокачественными новообразованиями и низкое число так называемых «ложноотрицательных» результатов) при однократном исследовании материала. Цитологическое исследование мазков из шейки матки является высокоэффективным

скрининг-тестом по раку этой локализации, ибо примерно в 10 раз повышает выявляемость опухолей по сравнению с визуальным обследованием; при этом значительно увеличивается относительная частота обнаружения рака в ранних и доклинических стадиях процесса.

На 2-м этапе ранней диагностики опухолей, наряду с необходимостью высокой чувствительности, к цитологическому методу предъявляется требование высокой специфичности (т.е. низкое число так называемых «ложноположительных» диагнозов злокачественного новообразования).

Задания по аудиторной работе

1. Нарисуйте схему устройства проточного цитофлюорометра.

2. Напишите характеристику флюорохромов, применяемых при иммунофенотипировании.

3. Дайте определение следующим дефинициям:
Фазово-контрастная микроскопия

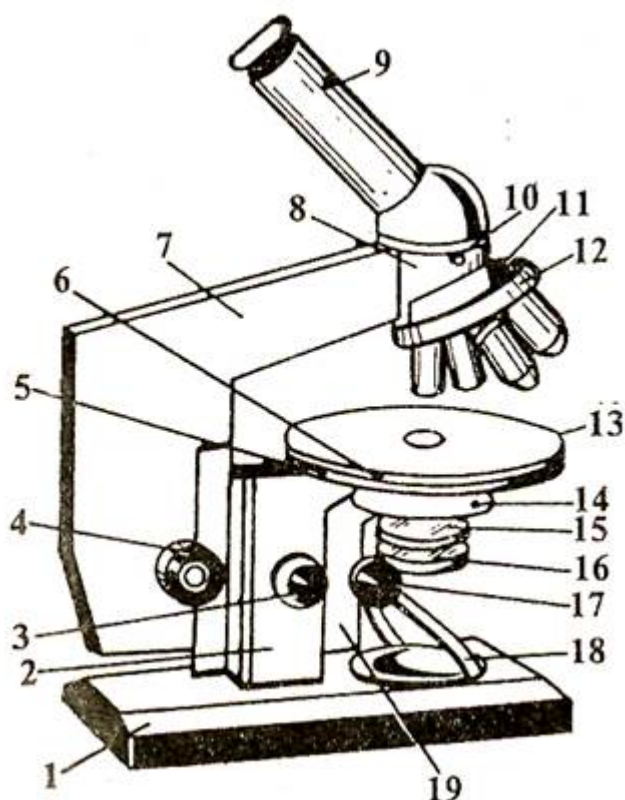
Поляризационные микроскопы

Интерференционные микроскопы

Флюоресцентной микроскопии

Цитоспектрофотометрш

4. Подпишите схему микроскопа «Биолам»



МОДУЛЬ 2

Оценка аналитических методов

ЗАНЯТИЕ № 8

Техническое оснащение современной клинической лаборатории.

Контрольные вопросы по данной теме

1. Техническое оснащение клинической лаборатории.
2. Оборудование и расходные материалы для взятия и первичной обработки биоматериала
3. Пробоподготовительное оборудование общего назначения
4. Оборудование, сочетающее функции разделения, детекции и измерения.
5. Оборудование для визуального наблюдения и регистрации структур и изображений.
6. Измерительные приборы
7. Оборудование для отдельных специальных процедур.

Исторически сложилось так, что техническое (приборное и аппаратное) оснащение лабораторной работы развивалось параллельно с ее технологическим совершенствованием. Выше уже приводились примеры иницирующей роли изобретения микроскопа и колориметра в становлении клинической лабораторной аналитики и диагностики как самостоятельной сферы научной и практической медицинской деятельности. Технические

новинки в ряде случаев становились основой для внедрения в лабораторную аналитику новых эффективных технологий, поскольку без этих приборов и устройств сама технология не могла быть осуществлена.

Так, принцип поляризации флуоресценции, используемый для определения лекарственных и ряда других соединений в биоматериалах, был освоен клиническими лабораториями только с появлением прибора, позволяющего измерять эту характеристику. С другой стороны, расширение диапазона видов лабораторных исследований, имеющих приборное оснащение, шло рука об руку с прогрессом самой лабораторной медицины как сферы научного знания и аналитики, и создание соответствующего прибора служило условием использования того или иного научного предложения на практике. Приборы разрабатывались в ответ на возникший в лаборатории метод, для его более быстрого и более стандартизованного выполнения. Таков, например, генезис всей гаммы приборов для обеспечения методов специфического связывания. Все более широкое внедрение на практику молекулярно-биологических методов обеспечено разработкой и производством всех необходимых для проведения полимеразной цепной реакции и других технологий этого рода приспособлений и устройств, вплоть до автоматического прибора «COBAS Amplico»), предложенного фирмой «Hoffman la Roche» (Швейцария).

Клиническая лабораторная аналитика широко пользовалась в своем техническом оснащении приборами, хорошо зарекомендовавшими себя в других отраслях науки и техники, приспособливая их для решения собственных аналитических проблем. Так появились в арсенале клинических лабораторий многие электрохимические измерительные устройства, хроматографы, радиометры, масс-спектрометры. При этом шел отбор приборов, способных воспроизводить наиболее точные и информативные аналитические процедуры. Так, высокопроизводительный жидкостный хроматограф дает более точные результаты, чем, скажем, бумажная хроматография с элюированием и последующей фотометрией элюатов пятен разделенных веществ.

Общая направленность усовершенствования технического оснащения КДЛ, как и их методического оснащения, состоит *в обеспечении наибольшей клинической информативности и аналитической надежности при сокращении времени оборота биоматериала и лабораторной информации о его содержимом и составе, т.е. срока между назначением анализа врачом и получением им результата исследования*

Базовое техническое оснащение лабораторных технологий.

Традиционно лабораторное дело складывалось как рукотворное занятие, в котором отдельные процедуры должны были обеспечиваться специально для них предназначенными устройствами и приспособлениями.

Оборудование клинической лаборатории можно разделить на несколько типов соответственно назначению и конструктивным особенностям.

А. Оборудование и расходные материалы для взятия и первичной обработки биоматериала.

Иглы (различного диаметра, в т.ч. двусторонние); скарификаторы, трепаны.

Стекла предметные и покровные.

Пробирки: обычные, центрифужные, вакуумные, с различными антикоагулянтами и консервантами, с разделительным гелем, с косым агаром.

Чашки Петри.

Флаконы для сбора мочи.

Посуда для сбора проб кала.

Устройства для концентрации проб мочи, спинно-мозговой жидкости.

Устройства для концентрации проб кала при поиске яиц гельминтов, цист и ооцист простейших.

Контейнеры для транспортировки проб биоматериал, в том числе изотермические.

Б. Пробоподготовительное оборудование общего назначения.

Мерная посуда: пипетки, мерные цилиндры и колбы.

Дозирующие устройства: полуавтоматические пипетки, дозаторы механические и электронные, диспенсеры, диллюторы, в том числе многоканальные, программируемые.

Встряхиватели.

Мешалки магнитные и механические.

Весы различных типов (будучи измерительными приборами, весы используются в современной лаборатории преимущественно для подготовки реактивов, если в этом есть необходимость, для калибровки некоторых приспособлений, а не для измерения содержания аналитов)

Холодильники.

Бани водяные

Инкубаторы

Термостаты.

Автоклавы.

Стерилизаторы

Центрифуги различных типов и размеров: гематокритные, настольные, напольные, ультрацентрифуги, с охлаждением.

Аппараты для дистилляции, деионизации и очистки воды.

Воронки, фильтры.

Устройства для фиксации и окраски мазков, цитологических препаратов.

Устройства для автоматического разлива сред в пробирки и чашки Петри.

Посуда для выращивания культур бактерий с различными средами.

Пробо-подготовительные автоматизированные системы

Системы для промывки микропланшетов: ручные, автоматизированные.

Посудомоечные машины: дезинфекционно-моечные, ультразвуковые.

Насосы вакуумные водоструйные или масляные.

Следует упомянуть также об устройствах, обеспечивающих необходимый температурный режим на преаналитическом этапе и в процессе

анализа. При транспортировке и хранении проб чаще всего необходима низкая температура. Этой цели служат транспортные холодильники-контейнеры для проб, которые представляются неременным условием эффективной деятельности централизованных лабораторий, в которые пробы биоматериала доставляются нередко из отдаленных медицинских учреждений. Большая часть анализов может сохраняться некоторое время в холодильниках, обеспечивающих постоянную температуру до + 5 °С. Некоторые анализы могут сохраняться лишь при более низких температурах: -20°С, - 35°С, -70°С, что требует специальных морозильников.

Полярные по отношению к предыдущей группе температурные условия создают стерилизаторы, функция которых высокотемпературным воздействием подавить активность микрофлоры и уничтожить ее споры на стенках лабораторной посуды многократного использования, на металлических предметах, в питательных средах и пр.

В. Оборудование, сочетающее функции разделения, детекции и измерения.

Установки для электрофореза, в т.ч. на твердом носителе (бумаге, мембране), геле, капиллярные, высоковольтные с охлаждением камеры.

Колонки для хроматографии: металлические, стеклянные.

Хроматографы: газовые, жидкостные, ионообменные с различными типами детекторов, в т.ч. хроматографы-масс-спектрометры.

Г. Оборудование для визуального наблюдения и регистрации структур и изображений.

Микроскопы: монокулярные, биноккулярные, флуоресцентные, лазерные, стереомикроскопы; микроскопы «пространственного изображения»; оснащенные устройствами для фото- и видеорегистрации изображений, для передачи изображений на расстояние; роботизированные.

Трансиллюминаторы и денситометры для просмотра и чтения электрофорсграмм, тонкослойных хроматограмм, фиксации и хранения их изображений.

Устройства для подсчета колоний микроорганизмов на чашках Петри.

Д. Измерительные приборы

а/оптические

Фотометры

Спектрофотометры

Флуорометры

Люминометры.

Нефелометры, в т.ч. лазерные

Турбидиметры

Пламенные фотометры

Атомно-абсорбционные спектрофотометры.

Отражательные фотометры.

Вертикальные фотометры (ридеры)

Денситометры.

Ридеры штрих-кодов

б/ электрохимические

Полярграфы.

Кондуктометры.

Потенциометры.

Кулонометры.

Ион-селективные электроды.

в/радиометрические

Бета-счетчики.

Гамма-счетчики.

Твердокристаллические.

Жидкостно-сцинтилляционные.

г/основанные на иных принципах

Урометры.

Поляриметры.

Осмометры

Вискозиметры

Рефрактометры.

Агрегометры.

Термометры.

Е. Оборудование для отдельных специальных процедур.

Устройства для определения скорости оседания эритроцитов

Термоциклеры (для полимеразной цепной реакции)

Поскольку каждое из этих устройств и приспособлений необходимо для выполнения какого-то этапа подготовки пробы или ее анализа, набор таких моноцелевых устройств является базальным для всех последующих технических усовершенствований.

Задания по аудиторной работе

1. Напишите техническое оснащение клинической лаборатории

2. Напишите и нарисуйте оборудование и расходные материалы для взятия и первичной обработки биоматериала.

3. Что относится к пробоподготовительному оборудованию общего назначения.

4. Какое оборудование, сочетают функции разделения, детекции и измерения.

5. Напишите и охарактеризуйте основные измерительные приборы.

6.Оборудование для визуального наблюдения и регистрации структур и изображений.

7. Какое Вы знаете, оборудование для отдельных специальных процедур.

ЗАНЯТИЕ № 9

Управление качеством клинических лабораторных исследований.

Контрольные вопросы по данной теме

- 1.Общие закономерности в деятельности работника лаборатории.
2. Международные стандарты в области обеспечения качества.

3. Влияющие факторы и виды вариации результатов клинического лабораторного анализа.
4. Понятие качества услуги.
5. Ятрогенные влияния.
6. Принципы управления качеством клинических лабораторных исследований.
7. Система мер по управлению качеством клинических лабораторных исследований

Основные положения

Деятельность работника лаборатории, как и любая другая деятельность, подчиняется определенным объективным закономерностям, которые следует знать и стремиться им соответствовать. Формой научно-обоснованного и согласованного выражения таких закономерностей являются стандарты, т.е. документы национальных и международных организаций по стандартизации. Одним из предметов стандартизации является качество и система мер по его обеспечению.

Проблема качества лабораторных исследований была впервые поднята американскими специалистами Belk, Sunderman в 1947 г., когда при сравнении результатов исследований, проведенных в нескольких лабораториях, выяснились существенные различия между ними. С тех пор вопросы обеспечения и контроля качества не сходят с повестки дня национальных и международных организаций специалистов лабораторной медицины. В литературе имеется большое число глубоких и обстоятельных исследований, рациональных рекомендаций.

В 80-90-е годы проблема качества лабораторных исследований, выполняемых в медицинских лабораториях, вышла на государственный и международный уровень. Общеизвестно необходимым декретировать требования по обеспечению качества медицинских лабораторных исследований документами государственного и межгосударственного характера. Такая форма их официального закрепления утверждает важность обязательного соблюдения необходимых условий для устойчивого получения надежной лабораторной информации, существенно важной для принятия правильных клинических решений, обеспечивающих успех диагностики болезней и лечения пациентов.

Международной организацией по стандартизации разработана серия основных документов в области обеспечения качества ISO 9000 - 9004. В последнее время они пополнились рядом документов, уточняющих международные требования по обеспечению качества применительно к работе лабораторий : ISO 9001:2000 "Системы управления качеством - требования", ISO/IEC DIS 17025 "Общие требования к компетентности тестирующих и калибрующих лабораторий "(пересмотр ISO / IEC Правило 25) и ISO / CD 15189 "Управление качеством в медицинской лаборатории". В рамках Европейского Союза те же цели преследуют документы серии EN 45000., а также Директива 98/79/ ЕС относительно требований к производству медицинских диагностических устройств для диагностики in-

vitro. Конфедерацией клинической химии Европейского сообщества (ЕС4) разработаны "Существенные критерии систем качества медицинских лабораторий".

Во многих государствах были разработаны и проводятся в жизнь общенациональные требования к качеству клинических лабораторных исследований. Так, в Германии Федеральной врачебной палатой были приняты "Правила обеспечения качества в медицинских лабораториях" (1988). В США требования к качеству лабораторных исследований по многим компонентам были облечены в форму документа, принятого Конгрессом и носящего название "Clinical Laboratory Improvement Amendments" (CLIA-88). Ряд детально разработанных правил, касающихся отдельных сторон обеспечения необходимого качества лабораторных исследований, разработан Национальным комитетом клинических лабораторных стандартов США. В нашей стране к этой области имеет отношение ГОСТ 16263 -70 "Государственная система обеспечения единства измерений. Метрология. Термины и определения", ГОСТ 15467-70. Качество продукции. Термины", ГОСТ 24525.2-80 "Управление качеством продукции" и ряд других стандартов.

Качество изделия или услуги можно рассматривать как степень соответствия требованиям потребителя или пользователя.

Задания по аудиторной работе

1. Заполните таблицу «Существенные влияния различных факторов на аналиты»

№ п/п	Факторы	Аналиты

2. Дайте характеристику понятиям
Внутрииндивидуальной или персональной вариацией

Квалиметрия

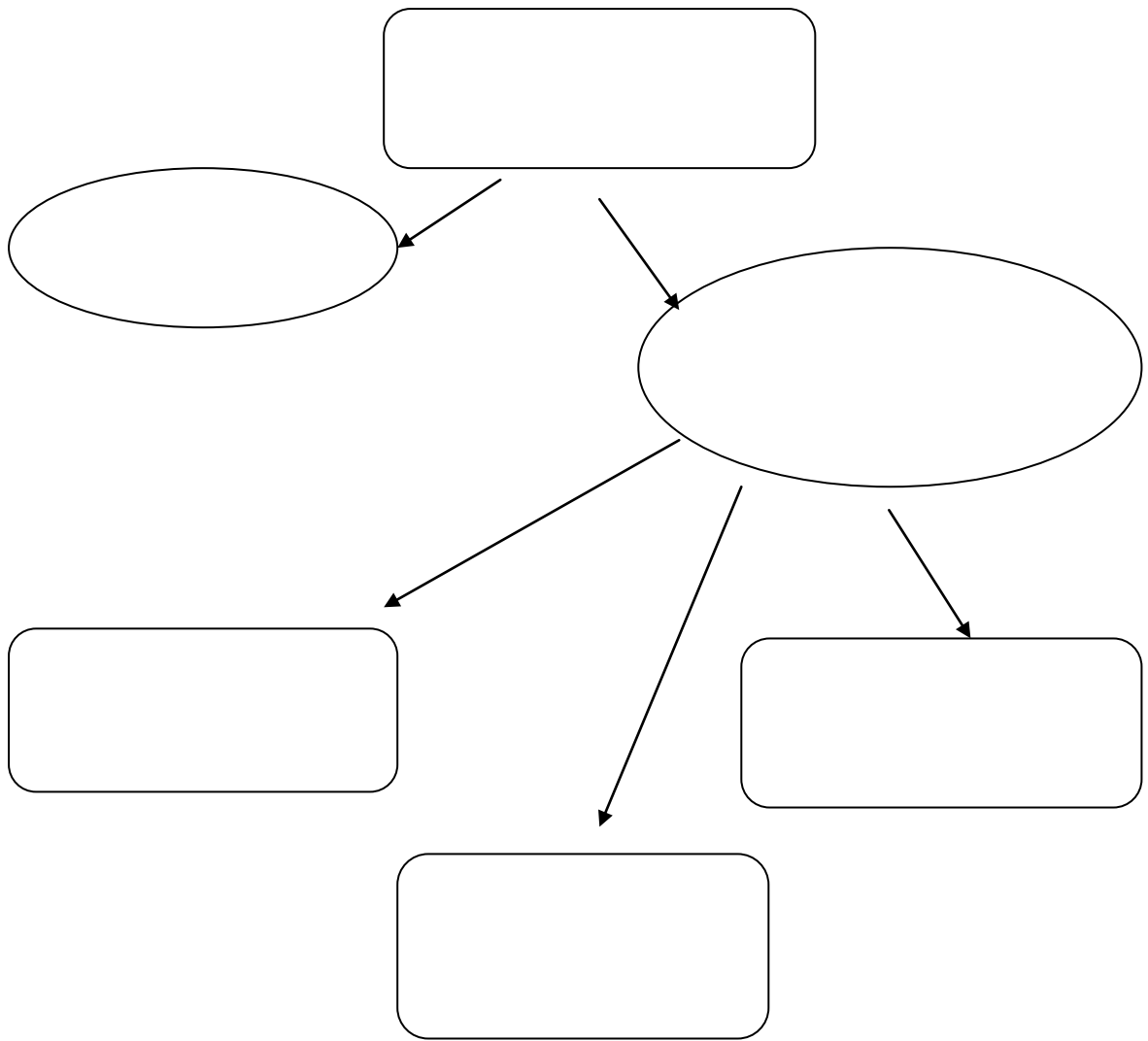
Система управления качеством

Биологической вариацией

Референтными пределами

3. Для достижения желаемого качества услуги необходимо.

4. Заполните таблицу «Хронобиологические факторы, влияющие на содержание компонентов биологических материалов»



5. Опишите ятрогенные влияния

6. Заполните таблицу «Механизмы интерференции лекарств»

Вид интер- бепенции	Механизм	Лекарство	Аналит	Измен.
Биологич. влияние in vivo				
Химич. и физич. интерфе- ренция in vitro				

7. Напишите внелабораторные факторы, влияющие на результаты лабораторных исследований

ЗАНЯТИЕ № 10

Основные требования к методам в клинической лабораторной аналитике.

Контрольные вопросы по данной теме

1. Оценка аналитической надежности клинических лабораторных методов исследования.
2. Аналитическая специфичность метода.
3. Иерархия аналитических методов и референтных материалов.
4. Правила проведения выбора клинических лабораторных методов при их стандартизации и унификации.
5. Научные основы планирования качества лабораторных исследований.

При рассмотрении лабораторных источников вариации результатов анализов первостепенное значение имеет оценка аналитических свойств применяемых методов исследований. Документ ISO 15189 Международной организации по стандартизации прямо устанавливает, что *в медицинской лаборатории качество должно быть обеспечено аналитическими процедурами, в том числе, свойствами применяемых методов исследования.* За примерно два столетия формирования и развития лабораторной медицины было предложено и внедрено в практику огромное количество разнообразных методов исследования. Для исследования некоторых аналитов, особенно тех из них, которые вызывают устойчивый интерес клиницистов (например, глюкоза, холестерин и т. п.) в настоящее время известны уже десятки методов исследования. Со временем стало ясно, что методы могут отличаться не только по своим принципам, но и по ряду свойств, которые могут быть положены в основу своего рода классификации. В зависимости от сочетания этих свойств метод может быть отнесен к той или иной градации в этой классификации.

Одним из решающих свойств метода является степень его аналитической надежности.

Оценка аналитической надежности клинических лабораторных методов исследования

Оценке аналитической надежности должны подвергаться все методы, рекомендуемые для широкого применения, как вновь разработанные, так и существенно модифицированные. В отличие от системы контроля качества работы лабораторий, которая должна давать ежедневную информацию о качестве получаемых в лаборатории результатов в процессе повседневного использования метода, оценка аналитической надежности метода - процесс, предшествующий использованию метода в практической работе. При оценке надежности метода задача состоит в выявлении погрешностей, зависящих от метода, поэтому важно эту оценку проводить не в одной, а в нескольких точно работающих экспертных (референтных) лабораториях с соблюдением всех указаний по применению метода.

Количественные аналитические методы клинических лабораторных исследований разнообразны и используются для определения различных по своим свойствам веществ, поэтому описываемые способы оценки надежности метода могут быть пригодны не для всех методов.

Основными критериями, по которым оценивается метод, являются правильность, воспроизводимость, специфичность, чувствительность, диапазон измерения. *Правильность метода* определяется правильностью результатов, полученных этим методом, и зависит от наличия систематических погрешностей метода. Правильность результатов - соответствие среднего значения результатов повторных определений одного и того же материала должной (номинальной) величине. Правильность не имеет числовой величины, она выражается количественной оценкой неправильности, т.е. смещением. Систематическая погрешность метода может быть обусловлена рядом причин: неспецифичностью метода или неправильным способом построения калибровочной кривой, использованием калибровочного материала недостаточной степени чистоты, неправильной постановкой холостой пробы и т. д. Статистическим критерием правильности является степень отклонения средней арифметической ($X_{\text{средн.}}$) от должного (номинального) значения (аналитическое смещение или сдвиг), выраженная в абсолютном значении или в процентах по отношению к должному значению. Правильность метода может быть оценена несколькими способами. *Способ добавки* - внесение в биологическую жидкость точно взвешенного количества анализируемого вещества, определение его с помощью исследуемого метода и сопоставление полученного результата с расчетным значением. *Способ смешивания проб* - биологическая жидкость с низкой и с высокой концентрацией исследуемого вещества смешивается в различных соотношениях. Процент выявления вещества, равный 90-110, считается удовлетворительным для клинических лабораторных методов. Способы добавки и смешивания проб (последний может быть применим в методах определения активности ферментов, где невозможно использовать способ

добавки) не всегда позволяют определить систематическую погрешность метода.

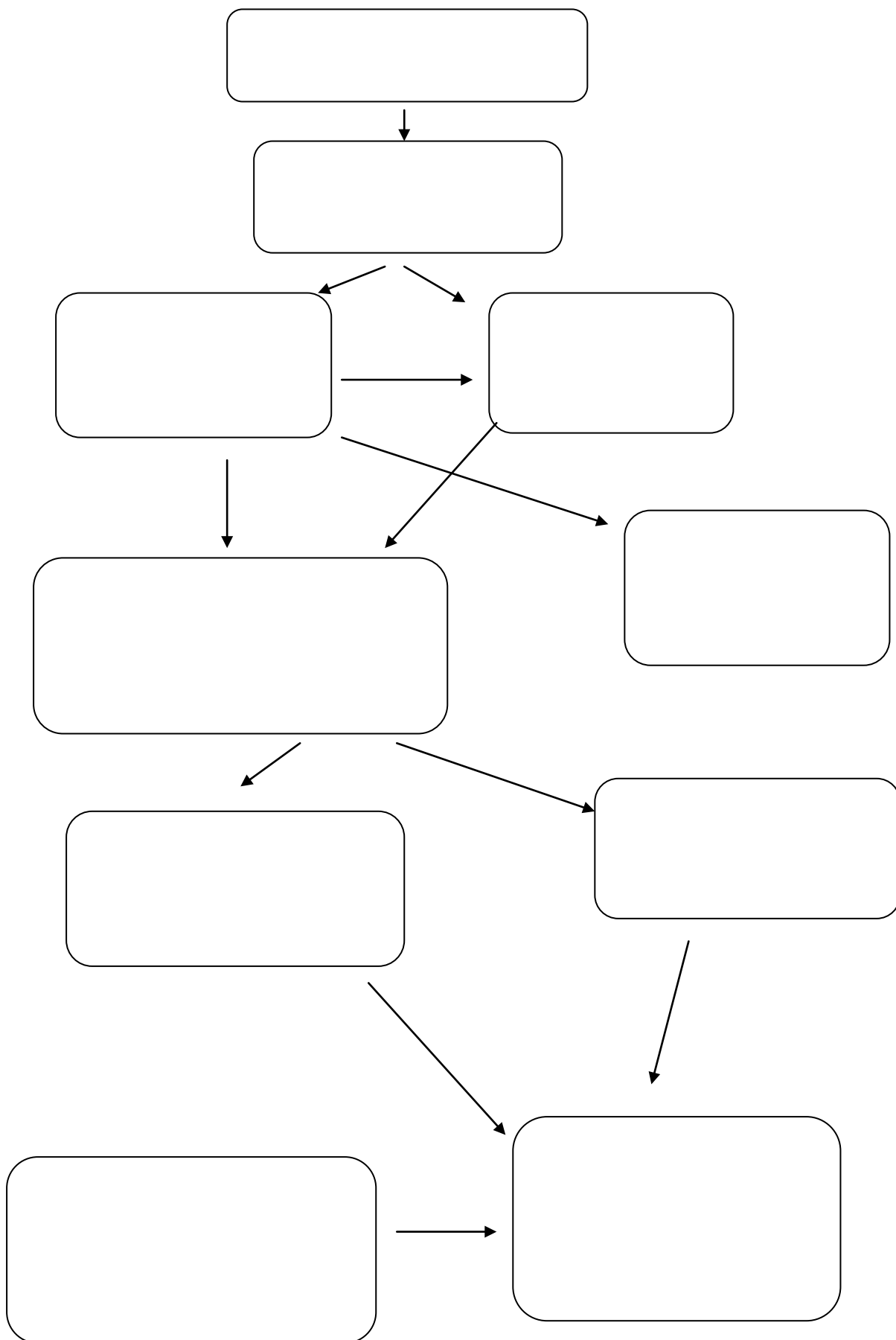
Задания по аудиторной работе

1. Напишите общие требования к референтным методам.

2. Опишите правила проведения выбора референтных методов.

3. Что влияет на выбор методов исследования для повседневной работы.

4. Заполните таблицу «Иерархия аналитических методов и референтных материалов.»



5. Какие возможности дает внутрилабораторного планирования качества лабораторных исследований.

ЗАНЯТИЕ № 11

Статистические методы в клинической лабораторной аналитике.

Контрольные вопросы по данной теме

1. Статистические методы.
2. Дисперсия.
3. Метод сравнение групп.
4. Регрессионный анализ.
5. Нормальное распределение.
6. Критерий хи-квадрат (χ^2).

Статистические методы широко используются во всех областях научной и практической деятельности, их применение каждый раз имеет свои особенности, которые определяются задачами и характером обрабатываемого материала. В клинической лабораторной диагностике статистические методы обработки материала используются для :

- контроля качества выполняемых исследований,
- оценки достоверности и сопоставимости используемых методов,
- калибровки,
- разработки норм (референтных или справочных значений).

Особенность статистической обработки любого клинического материала, в том числе и лабораторного, в том, что никакой случай не может быть отброшен, поскольку каждый раз это данные реального пациента. Если в экспериментальной работе исследователь может себе позволить повторить некоторые опыты, которые с его точки зрения получились неудачными, то в клинической практике это невозможно. Другое существенное отличие - это массовость материала. Экспериментальная или клиническая научная работа обычно оперирует двумя-тремя десятками случаев, а часто и меньшим их числом, что требует использования специальных методов обсчета так называемых «малых выборок». В то же время 30-40 анализов - это один день работы маленькой клинической лаборатории, в больших же лабораториях без всякого усилия собирается материал, измеряемый тысячами случаев. Третья особенность состоит в том, что распределение результатов клинико-лабораторных данных чаще всего не является нормальным, в том смысле, что не описывается Гауссовой кривой распределения. Ниже описываются те понятия и численные методы обработки данных, с которыми чаще всего приходится сталкиваться специалистам клинической лабораторной диагностики, при этом существо вопросов, для решения которых используются вычисления, не обсуждается. Отдельные примеры надо рассматривать лишь как иллюстрации к методам, а не как рекомендации по сути вопроса. Любая совокупность или множество однородных данных например, результаты измерений или данные лабораторных анализов, определенным образом распределены в том смысле, что какие-то результаты получаются чаще, чем другие и, соответственно, в большем числе присутствуют в накопленном материале. Кривая, которая на рисунке изображает это распределение, называется гистограммой. Практически лабораторная диагностика имеет дело не с кривыми, а с наборами точек или столбиков, т.е. с дискретными данными. Так как все лабораторные исследования выполняются с определенной точностью, эта точность и есть ширина столбика или расстояние между точками на рисунке. В ряде случаев, главным образом когда данных мало, несколько результатов, имеющих близкие значения, например 10,4 и 10,5, объединяют в один класс (или группу) и изображают на рисунке одной точкой или столбиком. Среди огромного числа возможных видов распределений особое место занимает так называемое нормальное или Гауссово, гистограмма которого симметрична и имеет колоколообразную форму. Это означает, что чем больше данный результат отклоняется от средней величины, тем он менее вероятен. Данные многих измерений: рост людей, размеры деталей, изготавливаемых на автоматических станках и др. подчиняются этому закону. К сожалению, лабораторные показатели составляют исключение: распределение результатов лабораторных анализов для группы пациентов, отражающее биологическую особенность - межиндивидуальный разброс, обычно асимметрично и не является нормальным, что осложняет обработку лабораторных данных. Однако, случайные погрешности (ошибки)

измерений, связанные именно с аналитическим процессом, как правило, распределяются нормально.

В научных исследованиях, когда в силу необходимости приходится оперировать ограниченным числом наблюдений, часто нет возможности проверить характер распределения, его молча принимают за нормальное и проводят статистическую обработку по правилам и критериям, разработанными для этого случая. Это не вполне корректное допущение, которое может стать причиной неправильного вывода. В повседневной работе врача-лаборанта материал практически неограничен, поэтому перед статистической обработкой следует проверить характер распределения, например, используя описанный ниже метод хи-квадрат (χ^2), и лишь в том случае, если окажется что распределение нормальное, использовать разработанные для нормального распределения методы статистической обработки.

Задания по аудиторной работе

1. Для чего используются статистические методы.

2. Чем характеризуется распределение.

3. На чем основан метод сравнение групп.

4. В чем суть критерий хи-квадрат (х 2).

ЗАНЯТИЕ № 12
Итоговое занятие.

Список литературы

1. Вороніна Л.М. Клінічна біохімія. – Харків: Основа, 2005.
2. Клиническая лабораторная диагностика: нац. рук. В 2 т. Т. 1. / гл. ред. В. В. Долгов, В. В. Меньшиков ; АСМОК. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. -928 с. : ил.- Предм. указ.: с. 918-923.
3. Клиническая лабораторная диагностика: нац. рук. В 2 т. Т. 2. / гл. ред. В. В. Долгов, В. В. Меньшиков ; АСМОК. -М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. -808 с. : ил.-Предм. указ.: с. 918-923.
4. Каллнер, А. Стандарты и рекомендации для клинической лаборатории / А. Каллнер// Клиническая лабораторная диагностика. -2010. -№ 2. -С. 47-54. - Библиогр.: с. 54.
5. Меньшиков, В. В. О разработке стандартизированных технологий клинических лабораторных исследований / В. В. Меньшиков, Л. М. Пименова// Клиническая лабораторная диагностика. -2011. -№ 8. -С. 55-57.
6. Меньшиков В. В. Об исследованиях и измерениях в лабораторной медицине / В. В. Меньшиков// Клиническая лабораторная диагностика. -2011. -№ 12. -С. 50-52. -Библиогр.: с. 52.
7. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами. / Под ред.. Е.С. Северина. – М.: Гэотар. – 2002. - 441с.
8. Преимущества динамической оценки качества измерений в клинико-диагностической лаборатории / А. М. Бондарев [и др.]// Клиническая лабораторная диагностика. -2014. -№ 1. -С. 62-65.
9. Максимова, Т. М. Симптомы, признаки и отклонения от нормы, выявленные при клинических и лабораторных исследованиях / Т. М. Максимова, Н. П. Лушкина// Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. -2011. -№ 6. -С. 3-6. -Библиогр.: с. 6.
10. Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия. Перевод с англ. – СПб.: Изд-во БИОНОМ «Невский диалект». – 2000. – 368 с.
11. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. 2-е изд., стереотипное. – М.: Медицина, 2002. – 544 с.
12. Клинический лабораторная аналітика. Том I. Основы клинического лабораторного / Под редакцией Меньшикова Н.И. - М.: Агат-Мед,-2002.- 860с.

Наклад – 70 прим. Замовлення №7854
Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26