

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ

Кафедра клінічної лабораторної діагностики

# **Етапи лабораторного дослідження**

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

для підготовки до практичних занять з клінічної лабораторної діагностики  
здобувачів II-IV курсів першого (бакалаврського) рівня  
за спеціальністю «Технології медичної діагностики та лікування»

Запоріжжя

2024

УДК 616-074/-076(075.8)

E88

*Затверджено на засіданні Центральної методичної Ради ЗДМФУ  
та рекомендовано для використання в освітньому процесі  
(протокол № від 2024 р.)*

**Колектив авторів:**

*С. В. Павлов – д-р біол. наук, професор;*

*С. А. Біленький – канд. мед. наук, доцент;*

*Н. В. Бухтіярова – канд. мед. наук, доцент;*

*С.В. Горбачова – д-р біол. наук, доцент;*

*Л. В. Баранова – канд. фарм. наук, ст.викл;*

*К. В. Левченко – канд. мед. наук, асистент;*

*К. А. Бурлака – PhD, асистент;*

*Д.В. Робота – асистент;*

**Рецензенти:**

*І. С. Качан - канд. мед. наук, доцент кафедри терапії, кардіології та неврології ННІПО;*

*Б. С. Бурлака - д-р фарм. наук, доцент кафедри технології ліків.*

E88

**Етапи лабораторного дослідження:** навчальний посібник для самостійної підготовки до практичних занять студентів-бакалаврів, спеціальності «Технології медичної діагностики та лікування» / С.В. Павлов, С.А. Біленький, Н.В. Бухтіярова [та ін.]; за заг. ред. С.В. Павлова. – Запоріжжя: ЗДМФУ, 2024. – 116 с.

Запропонований навчальний посібник «Етапи лабораторного дослідження» є необхідним для вивчення клінічної лабораторної діагностики студентами-бакалаврами, спеціальності «Технології медичної діагностики та лікування».

Навчальний посібник містить матеріали які дають можливість самостійно опанувати теоретичні питання, розгляд яких передбачає виконання програми та створити підґрунтя до засвоєння практичних навиків під час занять.

Для полегшення сприймання матеріалу, у посібник містить ілюстрації та схеми, що сприяє найбільш ефективному засвоєнню матеріалу.

**УДК 616-074/-076(075.8)**

©Колектив авторів, 2024

©Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, 2024

## ВСТУП

Клінічні лабораторні дослідження - це комплекс методів, що використовуються для отримання об'єктивних даних про стан функціональних систем організму людини. Результат лабораторного дослідження, представлений клініцисту, є підсумком ряду процесів, що протікають в організмі пацієнта, в тому числі під впливом циркадних ритмів сну і неспання, прийому їжі і її характеру, прийнятих ліків, лікувальних і діагностичних процедур, деяких фізіологічних станів. Кожен з цих факторів здатний вплинути на результат дослідження поза зв'язком з основним патологічним процесом і в його відсутність.

Не менший вплив на лабораторний результат може надати все, що пов'язано з взяттям, зберіганням і доставкою проб біологічних матеріалів, тобто з тими умовами, за які відповідальний персонал клінічного відділення. Персонал клінічних відділень повинен забезпечити дотримання умов збору і зберігання біологічного матеріалу, які б виключили виникнення в цих матеріалах небажані зміни досліджуваних компонентів.

*Лабораторне дослідження* – закінчений цикл із сукупності заходів, які необхідні для створення лабораторного аналізу. Лабораторний цикл складається з преаналітичного, аналітичного та постаналітичного етапів. На кожному етапі до лабораторного дослідження включається різний медичний персонал.

## **1. ПРЕАНАЛІТИЧНИЙ ЕТАП ЛАБОРАТОРНОГО АНАЛІЗУ**

Проблема забезпечення належної якості лабораторного дослідження нині дедалі більше зачіпає преаналітичний етап. На цьому етапі у підготовці матеріалу для дослідження беруть участь як лабораторний, так і нелабораторний персонал. Тільки спільними грамотними та скоординованими діями фахівців лабораторій, лікарів-клініцистів, медичних та процедурних сестер, найчастіше немедичного персоналу (водіїв, реєстраторів) можливе забезпечення правильних та достовірних лабораторних аналізів. Лабораторний персонал виконує необхідні аналітичні процедури, оцінює достовірність результатів досліджень, а клінічний персонал здійснює призначення лабораторних тестів, підготовку пацієнтів до їх проведення, взяття зразків біоматеріалів, остаточну інтерпретацію результатів та прийняття на їх основі рішень. Основа забезпечення якості на преаналітичному етапі – розробка та чітке дотримання інструкції щодо якості проведення цієї стадії лабораторного дослідження, а також максимальна стандартизація всіх основних моментів.

Призначення аналізу клініцистом. Підготовка пацієнта до досліджень. Підготовка пацієнта до досліджень – одна з важливих складових позалабораторної частини преаналітичного етапу. Лікар повинен пояснити пацієнтові необхідність лабораторних досліджень та інформувати його про те, як потрібно підготуватися до досліджень. З цією метою в лікувальному закладі розробляються стандартні операційні процедури (СОПи) лікарям, процедурним (постовим) медсестрам та пацієнтам ліжкових відділень госпіталю та пацієнтам амбулаторно-поліклінічного профілю з підготовки пацієнтів до здачі лабораторних досліджень.

Позалабораторна частина преаналітичного етапу починається з призначення лікарем конкретного пацієнта певної групи аналізів (компонент або

характеристика зразка, що підлягають вимірюванню), що входять до лабораторного дослідження. Саме лікар формує заявку з необхідним йому переліком аналітів, визначає умови підготовки пацієнта (наприклад, натщесерце, час взяття або збору біоматеріалу), матеріал, що досліджується (кров, сеча, кал, сперма).

Чинники преаналітичного етапу, здатні проводити результати лабораторних досліджень. До факторів, що вносять найбільш грубі зміни, часто є підставою для вибракування проби і відмови від виконання дослідження, відносять: гемоліз, ліпемію, наявність згустків та неправильний вибір консерванту. Однак не завжди вдається вчасно виявити ці помилки. Тільки значний гемоліз або ліпемія можуть бути виявлені візуально, а більшість помилок, що допускаються, часто не виявляється зовсім або виявляється лише випадково, вносячи небажані впливи в результат дослідження. Такими є:

- порушення підготовки пацієнта до аналізу;
- порушення правил відбору проби;
- порушення співвідношення кров/консервант;
- неправильна ідентифікація проби пацієнта;
- порушення правил зберігання та транспортування;
- пізня доставка.

Істотне значення мають час, місце, техніка і послідовність взяття біоматеріалу, положення тіла під час процедури, тривалість веностазу, правильність вибору консерванту чи транспортного середовища (для мікробіологічних досліджень), точність співвідношення реагенту і крові, адекватна ідентифікація проби.

Під час підготовки пацієнта до дослідження низку чинників, які впливають на результат (стаття пацієнта, етнографічні особливості, маса тіла, спосіб життя, вагітність) неможливо скоригувати. У той же час короткодійні, легко усунути фактори повинні бути прийняті до відома та скориговані для отримання найбільш достовірних результатів.

Дієта безпосередньо впливає на багато біохімічних і гормональних показників пацієнта. Значення має час, що минув після прийому їжі, і склад їжі. Так, за наявності в раціоні надмірної кількості білків та нуклеїнових кислот у крові та сечі зростає концентрація азотистих компонентів: сечовини, креатиніну, сечової кислоти. Переважне вживання в їжу вуглеводів та ліпідів призводить до підвищення рівня загального холестерину та тригліцеридів, до зсувів з боку ліпідограми. Різкі зміни у водно-сольовому режимі позначаються на секреції альдостерону, вазопресину, показниках ренін-ангіотензинної системи, а також концентрації електролітів. Крім того, існує ціла низка показників, що вимагають тимчасового обмеження прийому тих чи інших продуктів. Дослідження ліпідограми повною мірою достовірно при строгому обмеженні тваринних жирів (жирне м'ясо, олія, майонез, сметана, яйця та ін) не менше ніж протягом 3 діб. Це період елімінації із крові екзогенних ліпідів. Аналіз на катехоламіни та продукти їх деградації (метанефрини, ваніліл-мигдальна кислота) вимагає виключення на 3-5 діб продуктів, багатих серотоніном або кофеїном, які стимулюють секрецію мозкового шару надниркових залоз. До таких належать банани, сир, молоко, шоколад, кава та тонізуючі напої. Не слід вживати продукти, що містять ванілін. Рівень сечової кислоти слід визначати після обмеження вживання їжі, багатої на нуклеїнові кислоти (м'ясо, субпродукти, вина, горіхи та ін.). Обмін кальцію та фосфору також досліджують в умовах їх обмеженого надходження до організму. Протягом 5-6 діб слід уникати їжі, надміру багатої на ці мінеральні компоненти: м'ясо, молочні продукти, риба. При цьому необхідно пам'ятати, що харчові фосфати містяться як харчові добавки в ковбасних виробках і газованих напоях. Спільним для всіх біохімічних, клініко-лабораторних, ендокринологічних та інших тестів є вимога відбору матеріалу натщесерце, через 10-12 годин після останнього прийому їжі, а для деяких тестів – і більш тривалий час.

Алкоголь повинен бути виключений з раціону не менш як за 24 години до взяття біорідин. При систематичному втраті алкоголю у пацієнтів змінюються співвідношення активності ферментів у сироватці крові: активність ГГТП вища,

ніж АСТ та АЛТ, спостерігається збільшення активності альфа-амілази, креатинкінази.

У курців збільшено активність альфа-амілази, підвищено концентрацію раково-ембріонального антигену, С-реактивного білка, знижено концентрацію білірубіну, сечової кислоти, тригліцеридів.

Фізичне та м'язове навантаження, тренування, вправи призводять до зміни деяких показників – збільшення креатинкінази, підвищення активності катехоламінів. Тому вони мають бути виключені щонайменше за 3 дні до взяття біоматеріалу.

Ліки суттєво впливають на результати лабораторних досліджень по-різному – інтерферують у використовуваних аналітичних реакціях, пов'язують транспортні білки, впливають через метаболізм у печінці та нирках, резорбцирують у кишці. Тому, під час підготовки до проведення лабораторних досліджень прийнято такі підходи:

- ліки, що заважають визначенню досліджуваних компонентів, виключаються до взяття біоматеріалу, якщо вони даються за життєвими показаннями;

- ранковий прийом ліків здійснюється лише після взяття біоматеріалу;

- взяття крові з діагностичною метою проводиться перед проведенням інфузії ліків та розчинів.

На етапі доставки проби до лабораторії вирішальне значення мають оперативність, правильний температурний режим та дбайливе ставлення до матеріалу. Крім того, пофарбовані компоненти крові можуть розпадатися під дією прямих сонячних променів, пептидні та білкові гормони можуть піддаватися протеолізу, газу крові – дифузії. У деяких випадках, при аналізі вкрай нестабільних сполук виникає необхідність проведення негайної пробопідготовки (центрифугування, відділення сироватки від формених елементів, її заморожування).

Всі ці фактори перебувають у веденні клініцистів і практично не контролюються співробітниками клінічної лабораторної діагностики.

**Отримання матеріалу для дослідження.** Якісне взяття матеріалу є одним із стандартизуючих та визначальних моментів всього лабораторного дослідження. За даними літератури, від 46 до 65% лабораторних помилок відбувається на преаналітичному етапі.

**Витратні матеріали, що використовуються для взяття біоматеріалу.** Використання вакуумних систем – необхідний крок у створенні стандартних умов для взяття, транспортування та зберігання біологічних проб пацієнтів. Вакуумні пробірки (вакутейнери, вакуети, моноветти) призначені всім видів досліджень, крім газів крові.

Впровадження пробірок з транспортним середовищем, контейнерів для сечі, пластикових пробірок, вакуумних систем, засоби для їх застосування (голки, тримачі, адаптери) позитивно впливає на всі етапи лабораторного дослідження і, в цілому, переводить організацію роботи лабораторії на інший рівень. *На всі види мікробіологічних досліджень матеріал забирається лише у стерильні ємності.*

**Температурний режим.** У процедурному кабінеті під час взяття крові повинен дотримуватися температурний режим від 20 до 24°C, оскільки знаходження пробірок з біоматеріалом в інших умовах може призвести до гемолізу після її забору. Короткострокове транспортування (не більше 15 хв) пробірок при температурі від 4 до 30°C не має істотного впливу на функціональні властивості продукції. При тривалому зберіганні при температурі вище 40°C може статися деформація пробірок, а великі перепади температур можуть знизити ефективність пробірок за рахунок втрати вакууму і спровокувати неправильні результати аналізів.

**Порядок направлення на дослідження.** Правильно заповнений бланк-замовлення направлення на дослідження спрощує технологію взяття біоматеріалу процедурною (постовою) медичною сестрою, що зводить до мінімуму ймовірність помилок внаслідок людського фактору. Форма бланка-замовлення напряму розробляється співробітниками лабораторії разом із клініцистами. При складанні враховується основна вимога: зручність роботи для клініцистів, медсестер та лабораторних реєстраторів. За наявності лабораторної



інформаційної системи заповнений напрямок зчитується спеціальним сканером і заявлені аналіти автоматично переносяться до лабораторної інформаційної системи. У бланку вказуються: номер історії хвороби (ІХ) або амбулаторної карти, номер відділення, прізвище та ініціали хворого, вид дослідження, дата та час взяття матеріалу, прізвища лікаря.

При заборі крові використовують певну послідовність взяття крові у вакуумні пробірки: флакони для гемокультури; 2) пробірки без добавок (пластик, скло); 3) пробірки з цитратом для коагулології та визначення ШОЕ; 4) пробірки (пластик) з активатором згортання (і гелем) для сироватки; 5) пробірки з гепарином (і гелем) для плазми; 6) пробірки з ЕДТА для цільної крові (гематологія); 7) пробірки з фторидом/ЕДТА для дослідження глюкози, лактату, HbA1c, етанолу, гомоцистеїну.

**Отримання біоматеріалу та підготовка препаратів для морфологічного дослідження з органів та систем:**

**Отримання матеріалу із бронхолегеневої системи.** Матеріал для дослідження бажано збирати під час нападу кашлю, обов'язково в чистий, широкогорлий посуд, що добре закривається. Найкраще це робити вранці, коли бронхи максимально заповнені відокремленим. Щоб дослідження було точним, а процес збирання матеріалу легким, рекомендується:

- Пити багато води протягом доби до проведення аналізу.
- Попередньо прополоскати рот кип'яченою водою з 2% розчином соди.
- Безпосередньо перед збиранням матеріалу зробити 3 глибокі вдихи.
- Зібрати в ємність мокротиння, а не слину.

Для повноцінного дослідження необхідно 3-5 мл матеріалу, але провести аналіз можна і за меншої кількості мокротиння. Місткість слід доставити в лабораторію відразу після збору матеріалу, так як його аналіз потрібно проводити не пізніше ніж через 2 години після відхаркування.

При мікроскопічному дослідженні мокротиння підвищення результативності дослідження мокротиння більше залежить від збільшення

кількості порцій, з яких беруть матеріал, ніж збільшення числа приготовлених препаратів.

Клітинні та неклітинні елементи у мокротинні розподіляються нерівномірно, тому необхідно досліджувати кілька нативних препаратів або два, складені з усіх частин мокротиння. Зі складових частин поліморфного мокротиння потрібно зробити не менше 2-х, а при необхідності 3-4 комплексних препаратів. З нативного препарату, в якому виявлені клітинні елементи, що викликали інтерес мікроскопіста, слід готувати препарат для фарбування азур-еозином та/або Цилю-Нільсеном. Не можна готувати препарат для фарбування шляхом розтирання відібраного матеріалу між двома предметними шибками.

**Одержання матеріалу з органів травної системи.** Попередня підготовка обстежуваного для проведення копрологічного аналізу (макроскопічне, хімічне та мікроскопічне дослідження) складається із вживання їжі з дозованим вмістом білків, жирів та вуглеводів протягом 3-4 дефекацій. Цим вимогам відповідає дієта Певзнера.

*Дієта Певзнера* ґрунтується на принципі максимального харчового навантаження для здорової людини. Вона є нормальним харчовим раціоном здорових людей. У її денний раціон входить 400 г білого та чорного хліба, 250 г м'яса смаженого шматком, 100 г олії, 40 г цукру, гречана та рисова каші, смажена картопля, салат, квашена капуста, компот із сухих фруктів та свіжі яблука. Калорійність сягає 3250 ккал. Після її призначення у здорових людей при мікроскопічному дослідженні калу виявляються лише поодинокі рідкісні поля зору змінені м'язові волокна. Ця дієта дозволяє виявити навіть невеликий ступінь порушення ферментативної, евакуаторної здатності ШКТ та всмоктування у тонкій кишці.

*Дієта Шмідта* - щадна, лікувальна, включає 1-1,5 л молока, 2-3 яйця некруто, 125 г слабо прожареного рубаного м'яса, 200-250 г картопляного пюре, слизовий відвар (40 г вівсяної крупи), 100 г білого сухарів, 50 г олії, загальна калорійність 2250 ккал. Після вживання при нормальному травленні залишки їжі в калі не виявляються. За наявності патології з боку шлунково-кишкового тракту

дієта Шмідта протягом 3-4-5 днів виявляє лікувальну дію, проведений на тлі цієї дієти копрологічний аналіз може не виявити очікуваної патології.

При підготовці хворого для дослідження калу на приховану кровотечу з раціону виключається риба, м'ясо, всі види зелених овочів, помідори, яйця весняної кладки (зародок), лікарські препарати, що містять залізо, тобто каталізатори (гемоглобін, хлорофіл, залізо), що обумовлюють на кров.

Кал збирається після мимовільної дефекації у спеціально призначений посуд. Не можна направляти матеріал для дослідження після клізми, прийому медикаментів, що впливають на перистальтику (беладонна, пілокарпін), після прийому касторової або вазелінової олії, після введення свічок, препаратів, що впливають на забарвлення калу (залізо, вісмут, сірчаноокислий барій), приносити в КД у памперсах. Кал не повинен містити сечі. Місткість з фекаліями доставляється в КДЛ відразу після дефекації або не пізніше 10-12 годин після дефекації за умови зберігання в холодильнику при температурі  $+3 + 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

У лабораторії кал піддається макроскопічному, хімічному та мікроскопічному дослідженню.

**Отримання біоматеріалу з органів сечовидільної системи.** Для збирання сечі важливим фактором є якість посуду. Придатним контейнером для будь-якого зразка сечі є ємність з широким горлом. Контейнер для сечі повинен бути або одноразовим або з нього перед використанням повинні бути надійно видалені детергенти. По можливості треба збирати сечу в посуд, в якому вона буде доставлена до лабораторії. Якщо призначено мікробіологічне дослідження сечі, контейнер має бути стерильним. При дослідженні білків та гормонів слід запобігти абсорбції аналітів на стінках судини. Сечу з судна, качки, горщика брати не рекомендується, оскільки навіть після обробки цих судин у них може залишатися осад фосфатів, що сприяють розкладу свіжої сечі.

Щоб уникнути попадання сторонніх домішок сечу, не можна досліджувати під час менструації. Після проведення цитоскопії аналіз можна призначати не раніше ніж через 5-7 днів.

Застосовують три види збору сечі: ранкову порцію сечі, випадкові проби сечі (разова сеча) за певний проміжок часу або добову сечу.

Перша ранкова порція сечі, яка протягом ночі збирається в сечовому міхурі, краще використовувати для загального аналізу. Це виключає природні добові коливання показників сечі і тим більше об'єктивно характеризує параметри, що досліджуються.

Сеча повинна бути зібрана після ретельного туалету зовнішніх статевих органів у сухий, чистий, добре відмитий від засобів для чищення та дезінфікуючих посуд або в посуд разового користування, що випускається спеціально для збору сечі. Для аналізу можна збирати всю сечу, проте в неї можуть потрапити клітинні елементи, що не належать до сечоутворювальної та сечовидільної системи, такі, як клітини ороговілого плоского епітелію із зовнішніх частин статевих органів. Тому, як правило, першу порцію сечі не використовують. Другу порцію сечі збирають у чистий і сухий посуд. У той же час необхідно пам'ятати, що в першій порції сечі можуть бути діагностично цінні клітинні елементи, що свідчать про запалення уретри (двостаканна проба).

Посуд із сечею щільно закривається кришкою та доставляється до клініко-діагностичної лабораторії. Інструкцію про порядок збору сечі необхідно довести до кожного пацієнта, підкресливши важливість цього моменту для діагностики патологічних процесів. Аналіз сечі слід провести протягом 2 годин після отримання матеріалу. При тривалому знаходженні доставленої сечі в приміщенні відбувається руйнування клітинних елементів, відновлення уробіліногенів у уробіліни, що призводить до отримання хибно негативних результатів, контамінація бактеріями, грибами, життєдіяльність яких призводить до утворення аміаку, злущування сечі і збільшення значення рН.

Випадкові проби сечі можна збирати у час. Випадкові проби використовують для загальноклінічного дослідження та проби Нечипоренка. Перед збиранням сечі проводять ретельний туалет зовнішніх статевих органів. Лежачих хворих попередньо підмивають слабким розчином марганцево-кислого калію, потім промежину витирають сухим стерильним ватним тампоном у

напрямку від статевих органів до заднього проходу. Швидкість використання має важливе значення для морфологічної оцінки нестабільних компонентів сечового осаду. Для збору проб сечі у новонароджених дітей застосовуються мішки з гіпоалергенним покриттям, що приклеюється до шкіри. Область лобка та промежини мають бути вимиті з милом.

Проби за певний проміжок часу збирають після першого ранкового сечовипускання. Збір сечі за певний проміжок часу використовується під час проведення проби Зимницького, дослідження глюкозуричного профілю. Якщо для аналізу потрібно зібрати сечу за 10-12 годин, перед сном пацієнт повинен спорожнити сечовий міхур і відзначити час. Ця порція сечі відкидається. Потім хворий збирає сечу через 10-12 годин у приготований посуд, у якому проба доставляється у КДЛ. Аналогічно вдень проводиться збір сечі за 2-3 години.

Катетер або пункція сечового міхура можуть бути використані лише у крайніх випадках – у новонароджених, немовлят, пацієнтів із захворюваннями простати, іноді – для мікробіологічних досліджень. З катетера, що довго стоїть, сечу для досліджень брати не можна. Якщо використовується не вся зібрана сеча, то перед зливанням частини її необхідно ретельне збовтування, щоб осад, що містить формені елементи та кристали, не був втрачений.

Для дослідження добової сечі пацієнт збирає сечу на протязі 24 годин на звичайному питному режимі. Для збору краще використовувати пластикову ємність об'ємом не менше 2л. Слід нагадати пацієнтові, що першу ранкову порцію не беруть (нульовий час), цю порцію сечі виливають, а збирають усі наступні порції, причому остання порція береться у той час, коли напередодні було розпочато збір. Час початку та кінця збору відзначають. Якщо не вся сеча відправляється в лабораторію, кількість добової сечі вимірюють мірним циліндром, ретельно перемішують і відливають близько 50 мл в чистий сухий контейнер, який постачають відповідною етикеткою із зазначенням точного добового діурезу, і направляють на аналіз.

Визначення глюкози в сечі слід виконати не пізніше 2-х годин після сечовипускання. Протягом 8-12 годин (в добовому сечі) втрата глюкози

становить приблизно 40%, якщо не додавати стабілізатор. При істинній бактеріурії або при забрудненні (контамінації) сечі бактеріями та грибами з брудного посуду основною причиною зниження вмісту глюкози у сечі у хворих на цукровий діабет та повну відсутність глюкози у сечі здорових людей є життєдіяльність бактерій та грибів.

Якщо проводиться дослідження глюкози в сечі, то в посуд для збору сечі необхідно в якості стабілізатора додати 0,5 г азиду натрію.

**Одержання матеріалу з лімфатичних вузлів, молочної, щитовидної та інших залоз.** Матеріал з лімфатичних вузлів, молочної, щитовидної залози одержують за допомогою пункції тонкою голкою або зішкріба з віддаленої під час операції тканини. Діагностична пункція тонкою голкою зазвичай проводиться при патологічних процесах, що викликають у клініциста припущення про злоякісний характер ураження. Вона є єдиним можливим методом доопераційної морфологічної верифікації вузлових утворень, які потребують обов'язкового обстеження для виключення їх пухлинного характеру. Пункція дозволяє встановити природу поразок, вирішити питання тактиці ведення хворого. Якщо впевнено встановити характер процесу не вдається, виконується цитологічне інтраопераційне дослідження, як самостійний метод або додатковий до гістологічного дослідження. Технічно пункція виконується за подібною технологією, як приклад наведемо порядок пункції тонкої голкою щ.Щитовидної залози

Основними показаннями до діагностичної пункції є вузловий зоб. Поодинокі «холодні» вузли є найважливішим об'єктом пункції щитовидної залози. Саме в цій категорії хворих завдяки пункції в більшості спостережень вдається запобігти невиправданій операції або допомогти хірургу виробити адекватний план (обсяг) операції. При множинних вузлах зазвичай пунктують найбільш виражені з них або «несприятливі» з точки зору лікаря або фахівця з ультразвукової діагностики.

При дифузному нетоксичному зобі аспіраційна пункція дозволяє провести диференціальний діагноз між колоїдним або паренхіматозним зобом та

аутоімунним тиреоїдитом. При чітких клінічних ознаках злоякісного процесу цитологічне дослідження дає змогу уточнити план ведення хворих. Зокрема, при анаплазованому раку та злоякісній лімфомі оперативне втручання не показано, проте лікувальна тактика при цих процесах різна.

**Техніка виконання пункції.** Першим етапом обстеження є пальпація шиї для виключення утворень, не пов'язаних із щитовидною залозою. Діагностична пункція щитовидної залози повинна виконуватися під контролем ультразвукового дослідження, яке відіграє важливу роль у локалізації вузлових утворень, дозволяє зменшити ймовірність помилкових, і, що найбільш важливо, помилково-негативних висновків, пов'язаних з тим, що голка не потрапляє в патологічне вогнище. Крім того, відомості про результати ультразвукового дослідження допомагають цитологу правильно трактувати клітинний склад мазків.

Пункцію щитовидної залози виконують у положенні хворого лежачи на спині з невеликою подушкою під шиєю та плечима, при цьому м'язи шиї розслаблені. Можна використовувати місцеву анестезію лідокаїном. Значно покращуються результати дослідження, якщо пунктат одразу оцінюється цитологом (термінова цитологічна діагностика): при отриманні неповноцінного матеріалу одразу виконується повторна пункція. Для виключення злоякісного характеру ураження вважають за необхідне не менше двох пункцій – при первинному огляді та в динаміці. Матеріал розподіляють на шибках тонким шаром. Якщо при пункції щитовидної залози одержують рясний кров'янистий матеріал (що буває досить часто), його розподіляють на декількох стеклах, готуючи тонкі одношарові препарати, як готують мазки крові. Матеріал, що містить рідину, необхідно центрифугувати та готувати препарати з осаду. Значно покращується якість мазків під час використання цитоцентрифуги.

**Отримання матеріалу із жіночих статевих органів.** Мінімальна схема обстеження жінки повинна включати бактеріоскопічне дослідження мазків із трьох біотопів:

- уретри (діагностика ПСШ);

- заднього склепіння піхви (оцінка стану піхвового біоценозу, діагностика вагінозів та вагінітів);

- цервікальний канал (діагностика ІПСШ).

При необхідності додатково відбирають проби для культурального дослідження та ПЛР.

З вульви та напередодні піхви матеріал забирають ватним тампоном. При запаленні бартолінієвих залоз проводять їхню пункцію. Матеріал з матки одержують за допомогою спеціального інструменту – шприца-аспіратора. Після проходження зондом цервікального каналу порожнини матки розкривають зовнішню оболонку зонда і аспірують шприцом вміст матки. Взяття на дослідження матеріалу з придатків матки проводять під час оперативного втручання.

***Взяття досліджуваного матеріалу із піхви.*** Матеріал для аналізу одержують до проведення мануального вагінального дослідження. Дзеркало та підйомник вводять у піхву та за допомогою стерильної серветки прибирають надлишок виділень та слизу. Матеріал збирають із заднього склепіння або з патологічно змінених ділянок піхви двома стерильними тампонами. Перший тампон поміщають у стерильну пробірку і якнайшвидше доставляють у лабораторію для проведення бактеріологічного дослідження. Другий тампон використовують для виготовлення мазка. Мазок наносять на 2 предметні стекла. Якщо одночасно планується дослідження матеріалу з цервікального каналу або уретри все 2-3 мазки можна зробити на одному склі (в лабораторію в цьому випадку доставляють 2 скла, на кожному з яких знаходяться мазки з усіх біотопів, що обстежуються). Мазки маркують, висушують на повітрі і, помістивши у чашки

Петрі або спеціальні транспортні контейнери доставляють до лабораторії.

Якщо планується дослідження на гонорею, матеріал забирають тампоном, який негайно після взяття занурюють у транспортне середовище (наприклад, Еймс середовище з вугіллям). Матеріал повинен бути доставлений до лабораторії протягом 12 годин, не допускається його охолодження нижче 30°C.



При дослідженні на уреоплазми та мікоплазми матеріал забирають тампоном (ложкою Фолькмана, спеціальним зондом) і відразу суспендують у спеціальному поживному середовищі. Можна використовувати як єдине живильне середовище для мікоплазм та уреоплазм, так і окремі живильні середовища для кожного мікроорганізму. Матеріал повинен бути доставлений до лабораторії протягом 2 годин. Допускається збільшення термінів транспортування до 48 годин при зберіганні матеріалу при температурі 4-8°C.

При дослідженні трихомонади для збору матеріалу використовують сухий стерильний тампон. Відразу після взяття матеріалу його суспендують у пробірці (флаконі) з транспортним середовищем для трихомонад (розчином Рінгера). Матеріал повинен бути доставлений до лабораторії якнайшвидше, його охолодження не допускається.

***Матеріал із цервікального каналу.*** Показання до проведення дослідження – діагностика цервіцитів та ІПСШ.

Взяття матеріалу складається з наступних дій:

Голяють шийку матки за допомогою дзеркал, прибирають надлишок виділень та слизу стерильною марлевою серветкою або ватною кулькою, змоченими стерильним фізіологічним розчином або дистильованою водою і висушують стерильною сухою марлевою серветкою.

Якщо передбачається бактеріологічне дослідження (наприклад, гонорею), тонкий стерильний тампон акуратно вводять у цервікальний канал на глибину 1,0-1,5 см, обертають протягом 10 с, не торкаючись стінок піхви, і відразу ж занурюють у транспортне середовище (середовище Еймс із вугіллям).

Для дослідження на хламідії, мікоплазми, уреоплазми та віруси матеріал забирають за допомогою спеціальних цитощіток (зондів).

Порядок подальших дій залежить від обраного методу досліджень:

- культуральний метод – матеріал поміщають у живильне середовище; можна використовувати як єдине живильне середовище для мікоплазм та уреоплазм, так і окремі живильні середовища для кожного мікроорганізму; матеріал має бути доставлений до лабораторії протягом 2 год; допускається

збільшення термінів транспортування до 48 годин при зберіганні матеріалу за нормальної температури 4-8 °С;

- ПЛР – матеріал поміщають у мікропробірку з лізуючим буфером або фізіологічним розчином; зонд кілька разів обертають у пробірці для зняття матеріалу;

- РІФ (ПФ) – відразу після взяття матеріалу готують мазки на предметному склі; краще використовувати спеціальні скла з лунками, які зазвичай входять до складу діагностичних наборів.

### **Отримання матеріалу із чоловічих статевих органів.**

**Одержання еякуляту.** Преаналітичний етап дослідження еякуляту – одне із найбільш відповідальних під час проведення лабораторного аналізу. Клініцист, який призначив аналіз, та лікар лабораторії повинні спільно правильно орієнтувати пацієнта, уникати похибки при дослідженні еякуляту.

Підготовка чоловіка до проведення дослідження. При направленні на спермограму лікар зобов'язаний докладно пояснити пацієнтові, які умови підготовки він має виконати для отримання достовірного результату.

Еякулят повинен бути отриманий після утримання від сім'явипорскування протягом 2,5-4,5 діб, але не більше 7 днів статевої помірності. Пацієнт повинен забезпечити регулярні сім'явипорскування протягом 1-2 місяців перед дослідженням еякуляту для запобігання явищам застою.

Не вживати алкоголь у будь-яких кількостях протягом 6-7 днів. Намагатися виключити протягом 2,5 місяців перед дослідженням еякуляту токсичні фактори. Хронічні інтоксикації: алкогольна, тютюнова, наркотична, виробнича, побутова, лікарська та інші закономірно призведуть до зниження якісних, котрий іноді кількісних, показників еякуляту.

За наявності запальних захворювань уретри та/або простато-везикулярного комплексу рекомендується перед дослідженням еякуляту провести санацію, і для ліквідації медикаментозної інтоксикації почекати не менше 2 тижнів. Необхідно відмовитися від дослідження еякуляту, якщо протягом 7-10 днів перед аналізом були застудні або інші гострі захворювання, що протікали з лихоманкою.

Гіпертермія при станах, що лихоманять, порушує процес сперматогенезу, що протікає нормально при температурі на 2-3°C нижче температури тіла. При гіпертермії можуть знижуватися як кількісні, і якісні показники спермограми.

Напередодні здачі еякуляту на аналіз необхідно виключити тяжкі фізичні навантаження, конфліктні ситуації. Психоемоційний дискомфорт може призвести до порушення процесу одержання еякуляту.

Отримання еякуляту шляхом мастурбації за умов медичного закладу. Найбільш ефективним є отримання еякуляту шляхом мастурбації безпосередньо в медичній установі поблизу лабораторії, яка проводитиме сперматологічне дослідження. Для отримання еякуляту має бути виділене, по можливості, спеціальне приміщення. Необхідно дотримуватись високого рівня чистоти в приміщенні, ліквідувати сліди попередніх відвідувань. Температура у приміщенні має бути комфортною, не нижче 20-25°C.

Дуже важливим є психоемоційний настрій пацієнта перед мастурбацією. Тому лікар повинен дуже м'яко та доброзичливо пояснити пацієнтові, де і як він отримуватиме еякулят, при цьому знімаючи, по можливості, відчуття тривожності та невпевненості. Отримання еякуляту повинно проводитися в ідеально чистий сухий скляний (або одноразовий пластмасовий) посуд з досить широким горлом, нагрітий до температури тіла. Використання кремів, олій, вазеліну при мастурбації вкрай небажане. Після еякуляції не можна віджимати в баночку, останні краплі еякуляту з уретри, струшувати або змашувати в баночку краплі еякуляту, що потрапили на руки або голівку статевого члена.

Відразу після отримання еякуляту пацієнт повинен доставити отриманий матеріал у лабораторію. Пацієнт повинен повідомити лікаря про час, коли відбулася еякуляція, попередити, якщо було зібрано не весь обсяг чи еякуляція, було важко.

Отримання еякуляту з кондому. Це найбільш фізіологічний спосіб отримання матеріалу, проте гума презервативу та сперміцидне мастило моментально призводять до знешкодження та загибелі сперматозоїдів. Тому в матеріалі з кондому оцінюються лише кількісні параметри та морфологія, а

найважливіші параметри рухливості сперматозоїдів не досліджуються. У зв'язку з цим швидкість доставки матеріалу до лабораторії не має значення. Кондом з отриманим еякулятом можна зберігати в прохолодних температурних умовах (холодильник) добу та більше.

## **2. ВЗЯТТЯ КРОВІ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Більшість клінічних лабораторних досліджень проводиться у зразках крові: венозної, артеріальної чи капілярної.

Кров на всі види досліджень береться натще (останній прийом їжі через 8-12 год), до виконання діагностичних (ендоскопічне та променеве дослідження, біопсія, пункція, глибока пальпація та загальний масаж), функціональних (глюкозотолерантний тест, зондування, введення контрастних) лікувальних (ін'єкції, гемодіаліз, гемосорбція, плазмаферез та ін) процедур. Слід уникати інтенсивного фізичного навантаження. Перед взяттям крові не можна курити. При взятті крові важливе значення має становище пацієнта (сидячи, лежачи). Так у стаціонарних хворих кров забирається здебільшого у положенні лежачи, а у пацієнтів амбулаторно-поліклінічної ланки – у положенні сидячи. Тому важливо при повторних дослідженнях забирати кров у пацієнта в ідентичному положенні тіла.

В даний час показаннями для дослідження крові з пальця, яка забирається в основному фельдшерами-лаборантами або медсестрами відділень, є: дитячий вік пацієнта, опіки великої площі, важкодоступні або дрібні вени, виражене ожиріння, встановлена схильність до венозного тромбозу, а також аналізи газів, електролітів, глюкози та лактату, що виконуються в реанімації біля ліжка хворого (Point-of-care testing). У решті випадків слід забирати венозну кров. Це пов'язано з кращою відтворюваністю результатів дослідження, не вимагає спеціальних навичок у капілярному відборі, дозволяє уникнути ряду ускладнень (інфікування ранки, пошкодження окістя) та прискорює процес дослідження в лабораторії за рахунок застосування стандартних пробірок моноветт або вакутейнерів.

Взяту кров необхідно зберігати в закритій пробірці, вертикально в штативі і якнайшвидше (не менше 45 хв) доставити до лабораторії. Загальне правило отримання проб крові - якнайшвидше відцентрифугувати доставлений матеріал. Тривалий контакт сироватки зі згустком крові призводить до значних змін справжнього вмісту багатьох аналітів (калію, глюкозу, АСТ, ЛДГ).

**Взяття капілярної, венозної крові до виконання клінічного аналізу ручними методами.** Капілярну кров беруть при дрібних або важкодоступних венах, при необхідності щоденного моніторингу за показниками крові, наприклад, у онкологічних хворих на фоні хіміотерапії. У зв'язку з цим є важливим використання автоматичних скарифікаторів, що гарантують низьку травматичність і дотримання потрібної глибини проколу, залежно від типу скарифікатора. У багатьох лабораторіях при взятті гематологічних проб капілярної крові вважається допустимим порушувати співвідношення крові та ЕДТА, що призводить до викривлення кількості тромбоцитів при підрахунку в автоматичних аналізаторах.

При взятті капілярної крові можливий ряд особливостей, які буває важко стандартизувати: фізіологічні – холодні, ціанотичні пальці, методичні – малий обсяг досліджуваної крові та у зв'язку з цим необхідність розведення зразка для аналізу. Безпосередньо перед дослідженням кров необхідно ретельно перемішати протягом декількох хвилин для розведення антикоагулянту та рівномірного розподілу формених елементів у плазмі. Тривале постійне перемішування зразків до моменту їх досліджень не рекомендовано через можливе травмування та розпад патологічних клітин. Мазки крові рекомендовано робити пізніше 1-2 год після взяття крові.

Венозну кров вважають найкращим матеріалом для клінічного дослідження крові. Кров береться з кубітальної вени, джгут накладається трохи більше 1 хв, кулак розжимається після попадання перших крапель крові у пробірку. При більш тривалому накладенні джгута одержують завищені результати загального білка, альбумінів (+6-12%), понад 3 хв – аланінамінотрансферази (+10%),

білірубіну (+8%). При накладеному джгуті та стисненому кулаці значно підвищується рівень калію в плазмі (+15-25%).

Кров має надходити вільним струмом безпосередньо в пробірку, що містить антикоагулянт. Слід уникати використання шприца з голкою через його недостатню безпеку для медперсоналу та неможливість виключення гемолізу крові при перенесенні її під тиском у пробірку. Взяття крові шприцом без антикоагулянту з подальшим переливанням у пробірку неприпустимо через формування мікрозгустків та гемолізу. Крім того, в момент переливання крові в пробірку вона піддається впливу навколишнього середовища, що призводить до втрати стерильності та зниження якості зразка. Даний спосіб взяття проб венозної крові не може бути стандартизований і не забезпечує безпеку пацієнта та медперсоналу.

Рекомендованими голками для взяття венозної крові з метою оцінки стану гемостазу є голки з маркуванням діаметра просвіту (G) 22-19 (що більше номер, тим менший діаметр: 0,6-1,0 мм). У дітей можна застосовувати розмір 23. Дуже вузькі голки (більше 25 G) застосовувати не можна, тому що при кровотоку через голку з таким діаметром утворюється потік і активується система гемостазу. Голки з дуже широким просвітом (менше 16 G) можуть викликати гемоліз крові, що відбирається внаслідок турбулентності кровотоку в каналі голки. Після інфузії (трансфузії) найкоротший термін, після якого можна брати кров становить 1 годину. За необхідності проведення інфузії слід взяти кров із іншої руки. При взятті крові з внутрішньовенного катетера необхідно промити його фізіологічним розчином, потім перші 3-5 мл крові скинути у спеціальні пробірки.

Взяття крові вакуумними системами має ряд переваг, основними з яких є забезпечення високої якості проби та запобігання будь-якому контакту з кров'ю. Вакуумні системи складаються з трьох основних елементів, що з'єднуються між собою у процесі взяття крові: стерильної одноразової пробірки з кришкою та дозованим вмістом вакууму; стерильної одноразової двосторонньої голки або голки-метелика, закритої з обох боків захисними ковпачками; одно-або багаторазового голкотримача. Під дією вакууму кров втягується через голку і

безпечний клапан безпосередньо з вени в пробірку і відразу ж змішується з хімічним реактивом, що знаходиться як рідкого вмісту, так і нанесеного на внутрішні стінки пробірок. У практиці широко використовуються голки-метелики замість звичайних голок та тримачі, які необхідно використовувати при взятті крові у флакони для мікробіологічних досліджень.

**Взяття крові на дослідження на автоматичних гематологічних аналізаторах.** Етилендіамінтетраацетат (ЕДТА-К<sub>2</sub>ЕДТА або К<sub>3</sub>ЕДТА) – кращий антикоагулянт при підрахунку формених елементів крові з використанням автоматичних гематологічних аналізаторів. Використання Na<sub>2</sub>ЕДТА не рекомендовано внаслідок його поганої розчинності. Концентрація ЕДТА у взятій крові має бути постійною та становити 1,5-2,2 мг/мл крові.

Застосування антикоагулянтів гепарину або цитрату натрію супроводжується структурними змінами клітин, тому ці антикоагулянти не рекомендовані для використання як при автоматизованому, так і морфологічному дослідженні крові.

Необхідно суворо стежити за кількістю взятої крові, обсяг якої має відповідати зазначеній позначці на пробірці. Недотримання цієї умови, а також недостатньо ретельне перемішування крові призводить до зміни кінцевої концентрації антикоагулянту, що може спричинити появу мікрозгустків, неточне визначення концентрації клітинних елементів, спотворення морфологічної структури клітин. Для забезпечення в пробі точного співвідношення кров/антикоагулянт маса наповнювача в пробірках повинна відповідати заданому об'єму крові. Пробірки повинні заповнюватися повністю, в межах  $\pm 10\%$  від зазначеного обсягу (тобто пробірка на 4,5 мл повинна заповнюватися в об'ємі між 4 та 5 мл). Неправильне співвідношення кров/реагент у пробі веде до помилкових результатів аналізу. Відразу після заповнення та вилучення пробірки з тримача її потрібно акуратно перевернути кілька разів (кількість разів визначається типом наповнювача) на 180° для змішування проби з наповнювачем. Перемішування пробірок повинне відповідати певній кратності та проводитися повільними обертальними рухами відразу після заповнення їх

кров'ю та вилучення з тримача. Пробірки повинні бути вертикально поставлені в штатив і доставлені в такому вигляді в лабораторію. У погано перемішаній пробі утворюються мікрозгустки, що ведуть до спотворення результатів тестів, а також до поломок лабораторних аналізаторів внаслідок закупорки зон пробозбиральних. Пробу не можна трусити, її треба плавно перемішати. При надто енергійному перемішуванні можливі піноутворення та гемоліз, що може негативно позначитися на результатах лабораторних досліджень.

При виконанні гематологічних досліджень на значній відстані від місця взяття крові неминуче виникають проблеми, пов'язані з умовами транспортування. Під час перевезення пробірок з кров'ю рекомендовано використовувати герметично закриті пластикові пробірки та спеціальні транспортні ізотермічні контейнери.

**Одержання сироватки та плазми крові.** Основні закономірності при взятті крові для отримання сироватки та плазми.

Сироватка. При отриманні сироватки основна тенденція – прискорити зсідання крові без пошкодження клітин. Для цього кров пускають по стінці прибирання, щоб контакт зі стінкою активував згортання. У комерційних пробірках поміщають всередину полістеролові гранули для посилення контактної активації згортання.

У лабораторію може віддаватися як цільна кров, і відібрана сироватка. Венозна кров після взяття відстоюється в пробірці при кімнатній температурі (18-25°C) протягом 30-60 хвилин (до повного утворення згустку). Пробірки для дослідження сироватки слід центрифугувати не раніше, ніж через 30 хвилин після взяття крові, щоб гарантувати згортання крові. Сироватка повинна бути відокремлена від кров'яного згустку не пізніше двох годин після взяття крові. Для відокремлення сироватки від формених елементів необхідно: центрифугувати кров після утворення згустку при 1300 обертів протягом 10 хвилин; у пробірках з гелем - центрифугувати кров при 1500-2000 обертів протягом 10 хвилин, а потім відібрати сироватку в пластикову пробірку одноразову. Гель забезпечує стабільний бар'єр між сироваткою та форменими



елементами на 48 годин. Повторне центрифугування пробірок із гелем не дозволяється.

Отримана сироватка до передачі кур'єру повинна зберігатися в холодильнику (від +2 до +4°C) або в контейнері з хладогеном. Відібрану сироватку можна зберігати у холодильнику протягом 1-2 днів. Для більш тривалого зберігання (що не бажано) сироватку необхідно заморозити. Після розморожування сироватку необхідно ретельно перемішати. Повторне заморожування є неприпустимим.

Плазма крові. При взятті крові у пробірку слід забезпечити первинну взаємодію крові з антикоагулянтом, уникаючи контактного активування системи згортання.

На коагулологічні дослідження взяття крові здійснюється лише з вени. Кров пацієнта для визначення протромбінового часу та інших тестів на його основі до передачі кур'єру повинна зберігатися при кімнатній температурі (від +20°C до +24°C), центрифугувати не пізніше ніж через 45 хвилин після взяття, саме дослідження повинно бути проведене в протягом 2-х годин із моменту взяття крові. Зберігання в холодильнику або контейнері з хладогеном категорично заборонено. Для проведення інших тестів плазму слід зберігати при температурі від +2°C до +8°C не більше 4 годин. Допускається одноразове заморожування бідної на тромбоцити плазми при температурі від - 20°C до - 40°C на строк до кількох тижнів без значної втрати активності факторів згортання. Розморожування плазми слід здійснювати при температурі +37°C, повторне заморожування неприпустиме. Кров вирушає до лабораторії в день взяття. До наступного дня зберігати кров не можна! Транспортування крові на великі відстані та її часте струшування спотворює результати аналізів.

На імунологічні аналізи (вітаміни, гормони, імунний статус, електроліти) використовуються пробірки з літію гепарином (в т.ч. для дослідження іонів кальцію та магнію) або натрію гепарином. При кімнатній температурі плазму необхідно використовувати для аналізу від 2 до 6 годин після взяття зразка. Плазма відокремлюється центрифугуванням (1000-1500 обертів, 15 хвилин).

Якщо доставка в лабораторію здійснюється протягом дня, вона зберігається при температурі від +4°C до +8°C у холодильнику і доставляється в лабораторію в спеціальних транспортних контейнерах з хладогеном, час доставки плазми в лабораторію не повинен перевищувати 24 години. Для тривалішого зберігання плазма може бути заморожена при температурі - 20°C, при цьому вона може зберігатися до 4 тижнів. При швидкому заморожуванні до - 70°C термін зберігання може бути продовжений до 6 місяців.

На глюкозу застосовують пробірки з фторидом натрію + оксалат калію або фторидом натрію + K<sub>2</sub>ЕДТА в тому випадку, якщо кров зберігається більше 2 годин. Вважається, що еритроцити, навіть в осаді відцентрифугованої крові, здатні споживати за 1 годину до 10% глюкози плазми. Натрію фторид пригнічує процес розпаду глюкози у зразку до 6 годин при кімнатній температурі. Слід брати до уваги, що вміст глюкози в цілісній крові на 10% нижче, ніж у плазмі. Допускається зберігання проби до 24 годин у холодильнику при температурі від +4°C до +8°C у вертикальному положенні.

**Взяття крові для приготування товстої краплі.** Дослідження товстої краплі крові, пофарбованої за Романовським-Гімзою, є основним методом діагностики малярії та інших кровопаразитів (мікрофілярії, бабезії)

При виготовленні товстих крапель палець повертають проколом донизу. До виступаючих крапель крові торкаються предметного скла, на яке беруть 2-3 краплі крові і потім голкою або кутом іншого предметного скла кров розмазують, щоб отримати на склі овал діаметром близько 1 см або смугу довжиною 2-3 см. Шар крові не повинен бути занадто товстим, тому що в останньому випадку при висиханні він перетворюється на скоринку і легко відстає від скла. Після виготовлення товстих крапель їх висушують, поклавши скло на горизонтальну поверхню. Для прискорення висихання скла їх можна поміщати в термостат (30-35°C). Потрібно обережати стекла від запилення.

**Взяття крові з вени виявлення LE-клітин.** LE-клітини або клітини червоного вовчаку (LE-феномен) – це нейтрофіли або моноцити, що містять великі гомогенні базofilні включення, що є фагоцитованими ядрами загиблих

лейкоцитів, а власне ядро клітини відтіснене. Формування LE-клітин червоного вовчаку відбувається за наявності LE-фактора в крові та інших біологічних рідинах. LE-фактор – це фракція аутоантитіл до ядер клітин (анти-ДНК антитіла). Ці антитіла руйнують хроматин ядра, він перетворюється на аморфну масу, з якої утворюються гематоксилінові тіла, або вовчакові тільця.

LE-клітини можуть бути виявлені в крові при системному червоному вовчаку та деяких інших аутоімунних захворюваннях (системної склеродермії, дерматоміозиті).

LE-клітин крові досліджують у **препаратах лейкоконцентрату**. Є кілька модифікацій одержання лейкоконцентрату.

**Методика Цинкхама-Конлі** у модифікації Е. Н. Новосьолова.

Принцип. Механічна дія на кров, що полегшує утворення LE-феномену.

Реактиви. 1) натрію оксалат; 2) фарба Романовського-Гімзи чи азур-еозин; 3) метиловий спирт для фіксації мазків.

У пробірку з 10 мг натрію оксалату вносять 10 мл венозної крові, ретельно перемішують і залишають стояти на 1,0-1,5 год при кімнатній температурі. Вносять у пробірку 8-10 скляних намистин діаметром 3-4 мм, щільно закривають пробкою і перемішують, перевертаючи пробірку пробкою то вгору, то вниз протягом 30 хв. Потім відстоюють протягом 1 години при кімнатній температурі для поділу шарів. Плазму відсмоктують пастерівською піпеткою та вносять у центрифужну пробірку. Центрифугують при 1000 об/хв протягом 5 хв. Надосадову рідину видалюють, а з осаду готують мазки. Висохлі мазки фіксують у метиловому спирті та фарбують гематологічним барвником.

Методика Харгревес-Циммера. Реактиви: 1) метиловий спирт; 2) фарба Романовського-Гімзи чи азур-еозин.

У пробірку набирають 10 мл венозної крові і залишають при кімнатній температурі (можна в термостаті при 37°C) на 2 год. Кров, що згорнулася, виливають на металеве сито, поставлене на чашку Петрі, і порцеляновим пестиком протирають згусток. Вміст чашки Петрі переносять центрифужною пробірку і центрифугують при 2000 об./хв протягом 5 хв. Надосадову рідину

видаляють, а з верхнього шару осаду готують мазки. Висохлі мазки фіксують метанолом і забарвлюють за прийнятими в гематології методиками.

**Мікрометод.** У мірну центрифужну пробірку відмірюють 1 мл 3% розчину трилону і 4 мл крові, взятої з вени самопливом. Обережно змішують і ставлять термостат під кутом 45° при температурі 37°C на 15-20 хв. Як тільки відокремиться 2-3 мл плазми, верхній шар її обережно відсмоктують пастерівською піпеткою та виливають. Нижній шар плазми та лейкоцитарну плівку відбирають у центрифужну пробірку. Центрифугують протягом 10 хв при 1500 об/хв. З осаду готують мазки, фарбують як звичайні мазки периферичної крові. Кров можна брати не натще.

### **3. ОТРИМАННЯ МАТЕРІАЛУ ДЛЯ ЦИТОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ**

**Отримання спинномозкової рідини.** Ліквор частіше одержують люмбальною, рідше субокципітальною пункцією.

**Люмбальна пункція** проводиться між III і IV поперековими хребцями по лінії Quinke (лінія, що з'єднує найвищі частини гребенів двох клубових кісток). Пункцію можна проводити між L4-L5; L5-S1 та між L2 -L3.

**Субокципітальна** (цистернальна) пункція проводиться між основою черепа та 1-м шийним хребцем на висоті лінії, що з'єднує соскоподібні відростки.

При проведенні люмбальної пункції необхідно:

- перші 3-5 крапель ліквору видалити, що дозволяє звільнитися від домішки «шляхової» крові, що потрапляє в першу порцію ліквору внаслідок пошкодження голкою кровоносних судин, розташованих у епідуральному просторі;

- зібрати 3 порції (у виняткових випадках дві) у стерильні пробірки, щільно закрити, на кожній пробірці вказати її порядковий номер, ім'я, по батькові та прізвище хворого, час пункції, діагноз та перелік необхідних досліджень;

- зібраний у пробірки ліквор доставляється до клініко-діагностичної лабораторії негайно;

- у лабораторії відзначається час доставки ліквору.

За допомогою люмбальної пункції у дорослої людини можна без ускладнень отримати 8-10 мл ліквору, у дітей, включаючи дітей молодшого віку, 5-7 мл, у немовлят – 2-3 мл.

### **Одержання матеріалу для цитологічного дослідження випітних рідин.**

Евакуація випоту проводиться пункцією серозної порожнини. Пунктат вивільняють у чистий сухий, а при необхідності – у стерильний посуд. Пункцію повинен проводити лікар або процедурна медична сестра. До лабораторії слід доставити максимальну кількість рідини. Для дослідження рекомендується розділити пробу: 10 мл нативної рідини буде використано для біохімічних та серологічних досліджень. До решти рідини рекомендується додати антикоагулянти або стабілізатори:

- ЕДТА - для підрахунку клітинного складу рідини;

- гепарин для цитологічного дослідження та для вимірювання рН;

- фторид натрію для визначення лактату;

- цитрат натрію часто рекомендується використовувати 5% розчин цитрату натрію. Якщо є можливість досліджувати рідину відразу після її евакуації, то додавання цитрату натрію краще уникати. Розчин може впливати на морфологію клітин, викликаючи їхню деструкцію, а також змінювати реакцію середовища, що, у свою чергу, може призвести до поганого фарбування препаратів. До того ж рідина далеко не завжди піддається зсіданню.

Якщо проводиться біохімічне дослідження, одночасно слід відібрати 5 мл венозної крові для визначення градієнта «сироватка/випітна рідина» для альбуміну, а-амілази, білірубіну, холестерину, загального білка, ЛДГ і тригліцеридів.

Дослідження клітинного складу рідини, що згорнулася, неприпустимо, оскільки клітини при згортанні поглинаються згустком і в осад центрифугату не випадають або виявляються в незначній кількості.

### **Одержання матеріалів для паразитологічного дослідження.**

**Фекалії**, отримані після самостійної дефекації, доставляються до лабораторії свіжими (не більше добової давності) у кількості 10-50 г (об'єм

чайної/їдальні ложки).

Посуд, в якому кал транспортується і зберігається, повинен бути одноразовим, виготовлений з прозорого або напівпрозорого незабарвленого матеріалу (зі скла або пластику), з кришкою, що щільно закривається, не містити залишків миючих засобів. На наклеєній етикетці обов'язково, крім даних пацієнта, вказується дата та час збору проби. Матеріал, доставлений до лабораторії, досліджуються цього ж дня. При підозрі на стронгілоїдоз, анкілостомідози, трихостронгілоїдози матеріал необхідно досліджувати відразу після отримання його від хворого не пізніше 1 години.

У разі неможливості негайного дослідження матеріал можна зберігати із застосуванням консерванту в холодильнику (при  $t$  від  $+4^{\circ}\text{C}$  до  $+5^{\circ}\text{C}$ ). Кал заливається консервантом у співвідношенні 1:1 або 1:2, ретельно перемішується одноразовою пластиковою та чистою скляною паличкою. Як консервуючу рідину зручно використовувати рідину Барбагалло (3 мл формаліну 40% + 97 мл фіз. розчину). Даний розчин готується заздалегідь, зберігається за кімнатної температури, не втрачаючи тривалий час своїх консервуючих властивостей.

*Дослідження матеріалу, отриманого з періанальної області* проводять вранці, до гігієнічних процедур (підмивання, душ) та до дефекації. Зішкріб проводять дерев'яним шпателем, змоченим 50% гліцерином. Отриманий матеріал зчищають покривним склом у краплю 50% гліцерину, нанесену на предметне скло, закривають тим самим покривним склом і мікроскопують спочатку на малому, потім, при виявленні схожих об'єктів на яйця, на великому збільшенні. Дана методика має на увазі отримання матеріалу безпосередньо в лабораторії та проведення лабораторного дослідження *ex tempore*.

*Метод відбитка на клейку стрічку* загальнодоступний, може застосовуватися як в умовах стаціонару, так і при обстеженні пацієнтів поліклініки. Для проведення дослідження потрібна клейка стрічка шириною 1,5-2,0 см (можна використовувати канцелярський скотч або спеціальну операційну плівку). Відрізок клейкої стрічки фіксують на шпателі клейовою стороною назовні і роблять кілька відбитків зі складок періанальної області та ануса, після

чого акуратно приклеюють стрічку на предметне скло. Мікроскопія проводиться без покривного скла безпосередньо через клейку стрічку. Дослідити препарати треба пізніше однієї години після приготування, т.к. при більш тривалому зберіганні препарату яйця гострики можуть висихати та руйнуватися.

**Отримання матеріалу для дослідження шкіри та волосся.** Найбільш прості та швидкі лабораторні діагностичні тести, що вимагають мінімальних витрат часу та засобів: зіскрібки шкіри, трихоскопія, вичісування гребенем або щіткою, цитологія шкіри.

**Шкірні зіскрібки.** Для проведення шкірних зіскрібок необхідні мінеральне масло, предметне скло, лезо скальпеля або шпатель. Спочатку треба підстригти волосся з вибраних ділянок шкіри. Для отримання поверхневого зіскрібка достатньо пошкребти шкіру лезом скальпеля або шпателем, змоченим мінеральним маслом. Для отримання глибокого зіскрібку матеріал зіскоблюється до появи крапель капілярної крові. Матеріал наноситься на предметне скло з краплею мінеральної олії, накривається покривним та досліджується мікроскопією. Важливо проводити зіскрібок з периферії максимально свіжих вогнищ ураження. Необхідно ретельно дослідити всі поля зору препарату, причому успіх виявлення паразитів більше залежить від якості отримання матеріалу та вибору місця для зіскрібка, ніж від кількості стекол.

**Вичісування щіткою.** Дозволяє виявити деяких паразитів (бліх) та збудників дерматофітозу. Для цього необхідні такі матеріали: частий гребінь або щітка/зубна щітка, білий фільтрувальний папір, в деяких випадках живильне середовище для дерматофітів. Вичесане волосся поміщається на вологий фільтрувальний папір, за наявності екскрементів бліх легко виявляються червоно-коричневі крапки на білому папері. Поверхневих паразитів можна побачити за малого збільшення мікроскопа (об'єктив 4x) або за допомогою лупи.

**Трихоскопія.** Трихоскопія - Вивчення волосся. За допомогою трихоскопії можна діагностувати ряд хвороб фолікулів та волосся, провести оцінку вмісту лійки фолікула, ідентифікувати паразитів. Матеріал отримують видаленням хірургічним затискачем 50-100 волосин. При одномоментному видаленні трохи

більше 30 волосся ця процедура цілком безболісна. Вищипане волосся розміщують на предметному склі, попередньо додавши мінеральну олію. Препарат накривають покривним склом.

Трихоскопія може виявитися корисною при діагностиці деяких паразитарних хвороб, наприклад, дозволяє диференціювати педикулез і хейлетієльоз (гниди вошей щільно прикріплені до волосся, а яйця хейлетієл лежать вільно).

**Цитологія шкіри.** Цитологія шкіри – швидкий, неінвазивний метод, що має велику діагностичну цінність. Даний вид дослідження особливо цінний для діагностики нодулярних, ексудативних, гнійних поразок, при утворенні кірок і себореї, а також при отитах. При нодулярних ураженнях краще отримання матеріалу шляхом тонкоголкової аспірації за допомогою шприца об'ємом 10 мл з голками 21G, 24G. При поразках, що мокнуть, можна проводити дослідження мазків-відбитків. Також цитологічного дослідження піддають глибокі зіскрібки. Препарати висушують на повітрі, можна використовувати фіксацію метанолом чи барвником Diff-Quick. Перегляд препаратів проводять послідовно з використанням об'єктивів 4x, 10x, 40x, 100x (з імерсійною олією).

#### **Одержання біоматеріалу для мікробіологічних досліджень.**

**Загальні вимоги.** Збір матеріалу та проведення досліджень необхідно робити до початку лікування антибіотиками, антисептиками, протигрибковими препаратами.

Взяття матеріалу для мікробіологічних досліджень необхідно проводити в стерильні ємності (контейнери, пробірки, флакони з живильними середовищами та транспортними системами), бажано видані лабораторією, в якій проводиться дослідження

Зберігати видані транспортні середовища потрібно у холодильнику та зігрівати до кімнатної температури приблизно за 30 хвилин перед використанням.



Транспортні середовища необхідно контролювати кожного виду дослідження. Інформацію про транспортні середовища та інші витратні матеріали дивіться в описі.

Обов'язкове маркування пробірок, контейнерів, флаконів та транспортних середовищ із зазначенням П.І.Б., дати народження, дати та часу взяття матеріалу та локалізації, звідки отримано зразок.

При оформленні направного бланка заповнення всіх граф із зазначенням локалізації матеріалу та номера тесту. Інформація на бланку та матеріалі мають збігатися.

Необхідно дотримуватись термінів і режим зберігання проб, отриманих для досліджень.

**Збирання мокротиння.** Матеріал для дослідження бажано збирати під час нападу кашлю, обов'язково в чистий, широкогорлий посуд, що добре закривається. Найкраще це робити вранці, коли бронхи максимально заповнені відокремленим. Щоб дослідження було точним, а процес збирання матеріалу легким, рекомендується:

- Пити багато води протягом доби до проведення аналізу.
- Попередньо прополоскати рот кип'яченою водою з 2% розчином соди.
- Безпосередньо перед збиранням матеріалу зробити 3 глибокі вдихи.
- Зібрати в ємність мокротиння, а не слину.

Для повноцінного дослідження необхідно 3-5 мл матеріалу, але провести аналіз можна і за меншої кількості мокротиння. Місткість слід доставити в лабораторію відразу після збору матеріалу, так як його аналіз потрібно проводити не пізніше ніж через 2 години після відхаркування.

Процедура збирання мокротиння для дослідження на мікобактерії туберкульозу.

У момент відкашлювання мокротиння створюється дуже високий ризик повітряно-краплинного поширення інфекції. У зв'язку з цим бажано проводити збирання мокротиння або у спеціально виділеному вентиляваному приміщенні (пункті збору мокротиння), оснащеному бактерицидними лампами та засобами

дезінфекції, або на відкритому повітрі. Збір мокротиння повинен проводитися за безпосередньої участі медичного працівника.

Контейнер з порцією мокротиння достатнього об'єму (не менше 3-5 мл), що містить ущільнені або гнійні грудочки без слини, ретельно закривають кришкою, що загвинчується, потім контейнер маркують і поміщають в спеціальний бікс для транспортування в лабораторію.

Для збору діагностичного матеріалу використовують спеціальні контейнери з прозорого ударостійкого матеріалу, що не допускає просочування рідини і дозволяє оцінити кількість і якість зібраної проби, не відкриваючи кришку. Контейнери повинні герметично закриватися кришками, що загвинчуються, з ущільненням. Асептичний матеріал необхідно негайно доставляти до лабораторії.

При проведенні досліджень методом посіву для підвищення ефективності дослідження час між збором будь-якого матеріалу та його обробкою в лабораторії має бути мінімальним. При одноразовому заморожуванні діагностичного матеріалу життєздатність мікобактерій зберігається. Розморозувати та повторно заморожувати матеріал не можна.

**Промивні води бронхів.** Показання до проведення дослідження – запальні захворювання нижніх відділів дихальних шляхів за відсутності мокротиння. Дослідження промивних вод бронхів проводять за відсутності або убогості мокротиння. Це пов'язано не лише з технічною складністю взяття матеріалу, але й з меншою діагностичною цінністю результату внаслідок його значного розведення. Концентрація мікроорганізмів у промивних водах у 10–1000 разів менша порівняно з мокротою.

**Випітні рідини.** Для бактеріологічного дослідження взяття випітної рідини слід проводити у стерильні пробірки. Якщо передбачається дослідження аеробної та анаеробної мікрофлори, то рідину для бактеріологічного аналізу потрібно забирати в дві різні пробірки. Для анаеробної мікрофлори необхідні відповідні (анаеробні) умови транспортування. Якщо передбачається

досліджувати випадок виявлення мікобактерій туберкульозу, то стерильність не потрібно; на дослідження береться приблизно 20мл рідини.

### **Стабілізація, транспортування, зберігання матеріалу та проб.**

**Порядок транспортування біоматеріалу.** Однією з головних проблем є ігнорування впливу термінів постановки лабораторних тестів та правил транспортування проб до лабораторії. Наприклад, значної частини розбіжностей між автоматизованим і мікроскопічним підрахунком клітинних елементів викликана недотриманням термінів постановки тестів. Стандартизація термінів доставки та жорстке дотримання стандартів дозволить уникнути помилкових результатів. Перевезення крові у скляних пробірках із ватними пробками призводить до вбирання крові у ватний тампон, гемолізу. Перевезення проб, призначених для біохімічного або імунологічного аналізу без попереднього центрифугування призводить до спотворення результатів за рахунок впливу клітинних елементів. Одним із рішень, що дозволяють полегшити транспортування та збільшити терміни постановки реакцій, є застосування стабілізаторів та розділових елементів, наприклад гелів та гранул.

Загальне правило – доставити матеріал якнайшвидше, для деяких досліджень у короткі терміни 15-30-45 хвилин. Доставка пробірок повинна проводитися у вертикальному положенні, у штативі, уникаючи струшування. Транспортування біологічного матеріалу до лабораторних підрозділів повинно здійснюватися у спеціальних закритих від зовнішнього впливу пластикових контейнерах-укладках з кришками, що зазнають дезінфекції. Неприпустимо доставляти біоматеріал у кишнях, паперових пакетах чи сумках. Пробірки, контейнери із сечею та іншим біоматеріалом виставляються на стіл реєстратора у рукавичках. У зимовий час транспортування біоматеріалу вулицею при мінусових температурах має бути максимально скорочено.

**Вакуумні системи.** Для стандартизації умов взяття, транспортування та зберігання біологічних проб пацієнта було розроблено вакуумні системи. Щільно закриті пробірки запобігають контакту біологічного матеріалу з повітрям, випаровування проби, підвищення концентрації всіх нелетючих

компонентів. Строго дозовані у заводських умовах наповнювачі забезпечують необхідне співвідношення крові та реагенту для кожного виду досліджень. Доданий в пробірки з оксалатом або ЕДТА інгібітор калію (флуорид натрію) зберігає стабільність глюкози в пробі до 24 годин. Гель забезпечує стійкий бар'єр, максимально ефективно відокремлюючи формені елементи від плазми чи сироватки. Проба знаходиться в одній пробірці при взятті, транспортуванні, аналізі, зберіганні, що виключає необхідність переливання, зменшує можливість виникнення гемолізу та спінювання зразка. Вакуум виключає вплив тиску поршня шприца на формені елементи.

**Зберігання проб.** Проби, що зберігалися у холодильнику, перед проведенням аналізу необхідно нагріти до кімнатної температури. У процесі зберігання та транспортування проб крові суттєвий вплив на стабільність аналітів надають світло та сильна вібрація. Необережне поводження з контейнерами з кров'ю (сильна тряска, удари) може призвести до гемолізу. Під впливом прямого сонячного світла у зразку руйнуються білірубін, вітамін С, порфірини, креатинкіназа, фолієва кислота. На етапі отримання, зберігання та транспортування біоматеріалу в рамках оцінки якості контролю підлягають час взяття матеріалу, правильний вибір типу пробірки (антикоагулянт, стабілізатор), час відділення формених елементів, тривалість та умови зберігання зразка, час доставки матеріалу в лабораторію, цілісність контейнера зі зразком, Дотримання співвідношення крові та антикоагулянту Після взяття матеріалу пробірки маркуються та передаються кур'єру разом із напрямками. Номери на пробірках мають відповідати номерам на напрямках.

#### **4. ПРИГОТУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ ІЗ КРОВІ, СЕЧІ, МОКРОТИННЯ, КАЛУ, ЛІКВОРУ, ВИПІТНИХ ТА ІНШИХ РІДИН ДЛЯ МІКРОСКОПІЇ.**

**Приготування препарату.** Дослідження нативного препарату біопроби розцінюється як орієнтовний метод, що дозволяє ідентифікувати наявність ознак захворювання у досліджуваній пробі.

**Отримання осаду сечі та приготування нативного препарату.** У центрифужну пробірку наливають після розмішування 10-12 мл сечі, центрифугують зі швидкістю 1500-2000 об/хв протягом 10-15 хвилин. Надосадову сечу зливають швидким рухом (перекидають пробірку), а осад розмішують із сечею, що залишилася, пастерівською піпеткою. Краплю осаду за допомогою цієї піпетки поміщають на предметне скло і покривають покривним склом. Це нативний препарат.

Нативний препарат вивчають на малому збільшенні (окуляр 10х або бінокляр 7х або 10х, об'єктиви 8х та/або 10х, 20х), а потім на великому збільшенні (окуляр 10х або бінокляр з окулярами 7х або 10х та об'єктивом 40х). Зміст формених елементів (еритроцитів, лейкоцитів) підраховують у кількох полях зору великому збільшенні мікроскопа. Відповідь дають за кількістю клітин у полі зору (наприклад, 10-15 п/зр), якщо клітин мало – 0-2 в п/зр або поодинокі не в кожному п/зр. Якщо клітинних елементів багато і підрахувати в полі зору вдається, зазначають у бланку, що лейкоцити (еритроцити) густо покривають все п/зр. При мізерному вмісті таких формених елементів як циліндри дослідження проводять на малому збільшенні мікроскопа і вказують їх кількість в препараті (2 циліндра в препараті). Якщо циліндрів багато, їх кількість відзначають у зору, тобто. великому збільшенні мікроскопа. Для таких елементів, як епітеліальні клітини (багатошаровий плоский, перехідний, нирковий епітелій), кристали прийнято давати оцінку «велика», «помірна», «невелика» або «незначна» кількість, використовуючи мале збільшення мікроскопа.

Не можна робити препарат зі всього осаду, вибиваючи його на предметне скло, і мікроскопувати без покривного скла, оскільки препарат виходить багатошаровий, нерівномірної товщини, що спотворює оцінку кількості та якості (морфології) клітинних елементів та забруднює оптику.

**Нативний препарат калу.** Краплю калової емульсії наносять на предметне скло та покривають покривним. У цьому препараті при мікроскопічному дослідженні на тлі калового детриту виявляють залишки неперетравленої білкової їжі: сполучну тканину, м'язові волокна з смугастістю і без смугастість;

залишки неперетравленої вуглеводної їжі - клітковину, що перетравлюється; залишки нерозщепленого та розщепленого жиру: краплі, голки, глибки; кристали оксалату кальцію, трипельфосфату, Шарко-Лейдену, гематоїдину. У цьому ж препараті можна виявити слиз, якщо він потрапив у препарат, і укладені в ньому лейкоцити (нейтрофіли, еозинофіли), циліндричний епітелій, еритроцити, а також виявити яйця гельмінтів, найпростіші цисти та їх вегетативні особини.

***Нативний препарат мокротиння.*** Лаборант переносить доставлену в лабораторію мокротиння у чашку Петрі, а за великої кількості – у дві чашки Петрі. На робочому столі лаборанта, що працює з мокротою, повинні бути обладнані дві поверхні – одна біла, інша чорна, призначені для вивчення характеру мокротиння та приготування нативних препаратів та препаратів, призначених для цитологічного та бактеріоскопічного дослідження препаратів.

За допомогою довгих штапелів окремі складові фрагменти мокротиння переносяться на предметне скло: слиз, щільні ділянки слизу, білуваті тяжі, ниточки і плівочки, сірі ущільнені тяжі і прожилки, жовті або злегка забарвлені кров'ю грудочки або прожилки крові, виявлені на тлі слизу щільні ділянки та матові білуваті крупинки на тлі гною. На одному предметному склі має бути 2 нативні препарати. Під кожним покривним склом має бути не менше 4-5 фрагментів поліморфної за складом мокротиння. Якщо мокротиння однорідне, з 4-5 ділянок доставленого матеріалу готується один нативний препарат. Відібрані фрагменти мокротиння покривають покривним склом і притискають його нігтем. З нативного препарату можна приготувати препарат для фарбування, обережно зсуваючи покривне скло.

Мікроскопічне дослідження нативного препарату мокротиння має проводити лікар.

Клітинні та неклітинні елементи в харкотинні розподіляються завжди нерівномірно, тому необхідно досліджувати кілька нативних препаратів або два, складені з усіх частин харкотиння. Якщо приготування комплексних нативних препаратів викликає труднощі, необхідно готувати нативні препарати з кожної складової частини мокротиння, а з нативного препарату, в якому виявлені

клітинні елементи, що викликали інтерес мікроскопіста, готувати препарат для фарбування азур-еозином та/або Цилію-Нільсену.

### **Приготування фарбованого препарату.**

**Фіксація та фарбування мазків крові.** Найчастіше застосовують забарвлення по Романівському, Нохту та Паппенгейму-Крюкову. Для фіксації використовують спирт. У метиловому спирті фіксація продовжується 5-10 хв., в етиловому спирті – не менше 30 хв. При фарбуванні за Паппенгеймом фіксація мазків проводиться розчином еозин-метиленового синього по Май-Грюнвальду. В даний час практично всі клініко-діагностичні лабораторії набувають комерційних барвників, які є в широкому асортименті. Автоматична фіксація та фарбування мазків може бути здійснена за допомогою спеціальних пристроїв, у які завантажують нефіксовані мазки. Подальше автоматичне дозування фіксатора-барвника та буферних розчинів забезпечує стандартне та рівномірне забарвлення мазків.

**Фіксація та забарвлення цитологічних препаратів.** Якщо мазки передбачається фарбувати за методом Папаніколау, їх необхідно зафіксувати вологими відразу після отримання (волога фіксація). Фіксацію проводить спеціальними аерозолями або фіксатором у краплинній формі (фіксатор наносять на вологу поверхню мазка). Можна зафіксувати мазки, помістивши їх після отримання в кювету 96° етиловим спиртом на 10-20 хвилин. Потім мазки висушують на повітрі.

Якщо мазки передбачається забарвити методом Романовського (модифікації Лейшмана, Май-Грюнвальд-Гімза, Паппенгейма), їх після одержання висушують на повітрі (суха фіксація). Якщо передбачається фарбування гематоксилін-еозином, можна використовувати суху і вологу фіксацію мазків.

В даний час все більшого поширення набуває метод рідинної цитології. Головною відмінністю даного методу традиційного є те, що матеріал не наносять відразу на скло, а поміщають у флакон зі стабілізуючим розчином. Швидке консервування матеріалу дозволяє запобігти бактеріальному засміченню зразка,

пошкодженню клітин внаслідок їх висихання, зберігає зразок в оптимальних умовах для подальшого його транспортування в лабораторію та дослідження. Стабілізуючий розчин забезпечує збереження морфологічних, імуноцитохімічних та генетичних властивостей клітин. Отриманий матеріал можна використовуватиме проведення молекулярно-діагностичних досліджень.

**Приготування товстої краплі.** Товсті краплі після висушування повітря офарблюються фарбою Романовського-Гімза без попередньої фіксації. При цьому відбувається вилуговування (гемоліз) гемоглобіну з еритроцитів, і забарвлюються лейкоцити, кров'яні пластинки та плазмодії. Якщо товсті краплі зберігали незабарвленими більше тижня, їх слід попередньо обробити дистильованою водою протягом 10-15 хв, наливаючи воду безпосередньо на препарат. Видаливши зі скла дистильовану воду разом з вилуженим гемоглобіном, на них наливають розчин, що фарбує. Після фарбування товстої краплі препарати обполіскують водою. Найкраще промивати препарат, занурюючи його в баночку з водою, дотримуючись обережності, щоб не змити зі скла пофарбовану краплю.

### **Збагачення препаратів методами флотації, седиментації**

Методи збагачення широко застосовуються при паразитологічних дослідженнях. Зокрема, використання методів збагачення показано у всіх випадках, коли дослідження нативних препаратів дає негативні результати, а клінічні та анамнестичні дані свідчать про паразитарну інвазію. Для дослідження можуть використовуватися як свіжовиділені калові маси, так і законсервовані. Метод флотації полягає в накопиченні, зокрема яєць, гельмінтів у поверхневій плівці при суспендуванні калових мас. Флотаційні методи дають хороші результати, особливо виявлення легких яєць власоглава, аскариди, анкілостомід і карликового ціп'яка, тоді як великі і важкі яйця трематод можуть довго не спливати і накопичуватися в осаді.

Седиментаційні методи традиційно засновані на осіданні «важких» об'єктів (яєць та личинок гельмінтів) в осаді на дні пробірки в легкому інкубаційному середовищі (розчин етилацетату). Метод дозволяє виявляти яйця та личинки



гельмінтів, а також цисти найпростіших. Є комерційні одноразові набори для концентрації яєць та личинок гельмінтів методом седиментації. Парасеп – готовий до використання пластиковий одноразовий комплект, що містить необхідну кількість етилацетату, забуференого фіз.розчину та формаліну, що складається з круглодонної пробірки, вбудованого фільтра та конусної (центрифужної) пробірки.

Крім прямих копроовоскопічних методик, флотаційних та седиментаційних методів збагачення, у КДЛ проводиться дослідження матеріалу, отриманого з використанням спеціальних методів, спрямованих на виявлення конкретних збудників гельмінтозів. До них відносяться метод виявлення гостриків у періанальних складках за допомогою періанального зіскрібка/відбитка (різні модифікації), метод виявлення личинок кишкової вугриці (метод Бермана та його модифікації).

### **Цитоцентрифугування**

Цитоцентрифугування – технологія, основою якої є нанесення тонкошарового клітинного препарату на слайд із проби, отриманої під час використання рідинної цитології під час горизонтального центрифугування в системах спеціальної конструкції, де цитокамери герметично з'єднані з поверхнею слайдів. Процес осадження клітин на слайд під дією доцентрової сили відбувається аналогічно процесу в центрифужній пробірці. Технологія CytoSpin реалізується при використанні спеціальної цитоцентрифуги, яка має ряд моделей цитокамер складної конструкції, призначених для різних об'ємів та концентрації проб та кілька робочих каналів для створення від 2 до 8 робочих зон на одному препараті. Етапи технології цитоцентрифугування включають: отримання проби, перемішування проби, проведення додаткових операцій з поліпшення якості цитологічного препарату безпосередньо в цитокамері (відмивання та освітлення клітинних суспензій, лізис еритроцитів, розділювальне центрифугування в градієнтному розчині, корекція і слайда, горизонтальне центрифугування з осадженням клітинних елементів на слайд і отриманням препаратів для фіксації та фарбування (можлива фіксація та фарбування слайдів безпосередньо в

цитокамері), висушування препарату в спеціальній підвісці центрифуги за рахунок ефективної системи вентиляції, що виникає при обертанні. Застосування цієї технології на преаналітичному етапі можливе в будь-яких областях з цитології та комплексних діагностичних схемах. Цитоцентрифугування – технологія, що забезпечує збереження клітин для дослідження та отримання високоякісних тонкошарових препаратів на слайдах будь-якого типу та покриття. Ця технологія дозволяє: працювати з живими клітинами або здійснювати їхню фіксацію; використовувати різні обсяги проб та концентрації клітин; видаляти фактори, що заважають мікроскопії; - Створювати від 1 до 8 зон для дослідження на одному слайді; застосовувати різні способи фарбування або внесення зондів та імунохімічних маркерів.

### **Автоматизація етапу пробопідготовки**

Процес виробництва лабораторних аналізів включає низку процедур, пов'язаних із внутрішньолабораторною ідентифікацією зразка та підготовкою біологічного матеріалу до досліджень. Даний етап включає зняття кришок з пристроїв, в яких знаходиться біоматеріал, центрифугування проб, приготування та фарбування мазків; додаткове сортування та доставку підготовлених проб на автоматичні аналізатори для проведення досліджень. Автоматизація та стандартизація перелічених процедур має не менш важливе значення у роботі з безперервного підвищення якості результатів лабораторних досліджень, ніж автоматизація процесу їх виконання на автоматичних аналізаторах.

Лабораторна автоматизована система (ЛАС) - це комплекс програмних та технічних засобів, призначених для автоматизації різних технологічних операцій, пов'язаних із виробництвом лабораторних аналізів. ЛАС можуть включати такі пристрої:

- автоматичного збирання доставлених проб;
- переносники проб;
- скануючий пристрій для ідентифікації проб по штрих-кодах;

- автоматичні центрифуги; завантаження в центрифугу роблять автоматично, після центрифугування проби повертають у систему транспортування проб;

- детектор рівня сироватки визначає рівень сироватки в кожній пробірці, інформація про рівень зберігається в системі для подальшого використання пристрою дозування проб на порції;

- будову видалення кришок; кришки, що закривають пробірки, автоматично видаляються та поміщаються у спеціальний контейнер, що відповідає вимогам безпечного зберігання;

- пристрій для нанесення штрих-коду призначений для нанесення штрих-коду на вторинні пробірки;

- будову поділу проб на порції; сироватка автоматично переноситься у потрібній кількості з первинної пробірки в одну або кілька вторинних пробірок;

- вихідний модуль; пробірки автоматично поміщаються у вихідний пристрій, при цьому проводиться сортування за лабораторними аналізаторами та терміновістю тестування.

8.3. Основними цілями впровадження ЛАС у КДЛ є стандартизація технологічних операцій підготовки біоматеріалу до досліджень, виключення контакту персоналу з біоматеріалом та збільшення продуктивності праці. Лабораторія може використовувати 2 підходи для автоматизації:

- комплексні або тотальні, лабораторні автоматизовані системи;

- модульна, покрокова автоматизація окремих процесів у лабораторії чи відділів лабораторії.

Комплексні лабораторні автоматизовані системи призначені для повної автоматизації всіх етапів процесу отримання результатів лабораторних досліджень КДЛ. Впровадження комплексних ЛАС у КДЛ обґрунтовується необхідністю проведення великого чи дуже великого обсягу лабораторних досліджень (понад 5-7 млн. тестів на рік). Комплексні ЛАС вимагають великих фінансових витрат, які окупаються не менш як через 2-3 роки. Вони економічно не вигідні для середніх та малих КДЛ. Основним напрямком автоматизації для КДЛ, що виконують менше 5000000 лабораторних аналізів на рік, є модульна

покрокова автоматизація. Модульна автоматизація дозволяє вирішувати проблему створення сучасної автоматизованої лабораторії за допомогою низки послідовних кроків. При здійсненні модульної автоматизації перший крок – встановлення аналізатора щодо аналізів в автоматичному режимі. Наступним кроком може бути підключення до аналізатора роботизованої станції для завантаження проб у аналізатор та їх розвантаження. Надалі можна буде здійснити підключення роботизованої станції до лінії транспортування, в результаті буде досягнуто комплексної автоматизації процесу виробництва даного виду аналізів.

## **5. АНАЛІТИЧНИЙ ЕТАП ЛАБОРАТОРНОГО АНАЛІЗУ**

### ***Техніка основних маніпуляцій під час виконання лабораторного аналізу***

**Техніка дозування рідин.** Дозування проби та реагентів – обов'язковий етап більшості аналітичних процесів. Точність дозування безпосередньо впливає на точність одержуваного результату. Практично всі дозатори, що застосовуються в КДЛ, використовують один із двох методів:

**1. Метод прямого дозування** – спочатку рідина заповнює точно заданий об'єм, а потім максимально повно витягується з цього обсягу в пробірку. Під час піпетування натискають на головку плунжера великим пальцем до першої зупинки. Зануривши наконечник піпетки в розчин, повільно звільняють плунжер. Наконечник набирає необхідний об'єм рідини. Для того, щоб злити рідину, повторно натискають на головку плунжера, але тепер вже до другої зупинки, тобто до упору. При цьому з наконечника видаляються усі залишки рідини. Потім палець піднімають, плунжер повертається у вихідне положення

**2. Метод зворотного дозування** – рідина заповнює більший об'єм, а потім із пристрою витягується строго задану кількість рідини. При зворотному способі піпетування натискають головку плунжера великим пальцем до упору. Занурюють наконечник піпетки розчин і повільно звільняють плунжер. У наконечник набирається об'єм рідини, але дещо більший, ніж потрібно. Для дозування заданого об'єму натискають головку плунжера тільки до першої зупинки. Частина рідини, що залишається після цього в наконечнику, в

вимірюваний об'єм не входить. Її необхідно видалити, що здійснюють дотисканням плунжера до упору. Потім звільняють палець і плунжер повертається у вихідне положення. Зворотним способом зручно користуватися при дозуванні легко піняться і в'язких рідин.

При використанні скляних дозаторів піпетки лаборант візуально стежить за заповненням рідиною об'єму піпетки, намагаючись, щоб меніск точно збігся з градуювальною ризиком, нанесеною на піпетці. Основний недолік цієї технології – велика залежність точності дозування від майстерності та уважності лаборанта.

Автоматичні піпетки служать для швидкісного маніпулювання при відборі та дозуванні рідин, є пристрій з пневматичним механізмом, дія якого заснована на витісненні рідини повітрям. За конструктивними особливостями автоматичні піпетки можна характеризувати за такими основними групами: механічні та електронні, одноканальні та багатоканальні, фіксованого та змінного об'єму.

Механічні автопіпетки мають пружинний механізм і дозуючий пристрій - мікрометричний гвинт. Приводяться в дію вручну. В електронних піпетках пневматичний механізм керується мікропроцесором із електроживленням від акумуляторів. Одноканальні автопіпетки знайшли найбільше застосування у лабораторіях. Багатоканальні автопіпетки за продуктивністю значно перевищують одноканальні, але сфера їх застосування обмежена рамками вузькоспеціальної апаратури. Це визначає конфігурацію їхньої кінцевої частини. Найчастіше в лабораторіях використовуються багатоканальні піпетки для імунологічних досліджень, які розраховані працювати з плашками суворо певних параметрів.

Точність та відтворюваність вимірювань, що виконуються автопіпетками, коливається в межах від  $\pm 0,5\%$  до  $\pm 3\%$ , залежно від типу автопіпеток. Автопіпетки, як правило, не збільшують точність дозування, вони лише полегшують та прискорюють роботу. Тому для точних аналітичних цілей переважно використовувати калібровані за обсягом (зважуванням на аналітичних вагах обсягу дозування дистильованої води) скляні піпетки.

Є обмеження величину дозування, особливо в ручному виконанні. При роботі з біологічним матеріалом з різною густиною (кров, плазма, сироватка крові, сеча, слинна рідина і т.д.) рекомендується при ручному дозуванні використовувати об'єми не менше 3-5 мкл. Враховуючи, що при проведенні біохімічних, імунохімічних досліджень співвідношення біопроба/реагент, як правило, знаходяться у співвідношенні 1:10-1:100, обсяг реакційної суміші (кювет) не повинен бути меншим за 300-500 мкл.

Початкове калібрування дозаторів проводиться на підприємстві-виробнику. Калібрування в умовах лабораторії має здійснюватися дистильованою водою при температурі +22 градуси, і для калібрування потрібні аналітичні ваги з точністю близько 0,001 мг.

У лабораторних аналізаторах дозування здійснюється за рахунок роботи крокових двигунів, використання багатоканальних наконечників (забезпечують змив реагентів з поверхонь) та складних схем дозування, при яких більший обсяг реагенту змиває всю біопробу. Стандартне гарантоване дозування в лабораторних аналізаторах дозволяє працювати з обсягами менше 1 мкл і істотно скоротити кількість реагентів, що використовуються.

**Техніка зважування.** У клініко-діагностичних лабораторіях зважування проводять на аналітичних терезах, призначених для визначення маси тіл з високою точністю. Працюють із зразками невеликих обсягів. Терези дозволяють визначати масу порошків, рідин, твердих тіл, а також невеликих за розмірами тварин.

Висока дискретність (точність) аналітичних ваг 0,01 мг досягається рахунок використання технологічного рішення – електромагнітної компенсації, завдяки чому відбувається миттєвий відгук зміни маси. Точність вимірювань також забезпечують вітрозахисні екрани з автоматизованим або ручним приводом, а заряди статичної електрики нейтралізуються вбудованим або додатково встановлюваним іонізатором. Пристрої мають двонаправлені інтерфейси, що дозволяє підключати комп'ютер, принтер, зберігати дані на флеш-картки.

Калібрування аналітичних ваг може проводитись декількома способами. У багатьох моделях передбачено механізм автоматичного калібрування за допомогою вбудованих гирь. Також можливе ручне зовнішнє калібрування – для цього додатково купуються еталонні гирі. Калібрування необхідне при кожному переміщенні пристроїв з місця на місце, при зміні температури навколишнього середовища, поштовхах, ударах, вібрації тощо.

**Техніка фільтрації.** Фільтрування рідин у лабораторії проводять за допомогою вирв, у які вкладається спеціальний фільтрувальний папір. Фільтрування здійснюється або в режимі постійної різниці тисків (наприклад, вакуум-фільтри) або в режимі постійної швидкості. Всі сучасні способи очищення можна розділити на дві великі групи: механічні фільтри, що є перфорованою перегородкою тієї чи іншої конструкції, та очищувачі в силових полях (гравітаційні, відцентрові, магнітні, електростатичні). Недоліком перших є мала брудоемність, збільшення перепаду тиску в міру забивання отворів або пір в перегородці, обмеження за ступенем забрудненості, що подається на очищення рідин, великі габаритні розміри, що збільшуються в міру збільшення пропускної здатності або тонкості очищення. Все це призводить до необхідності періодичної заміни або регенерації елемента, що фільтрує.

**Центрифугування.** Центрифугування піддається різний матеріал, тому ця процедура має бути строго стандартизована. При лабораторних дослідженнях загальним правилом для всіх видів проб є вимога якнайшвидше відцентрифугувати доставлений матеріал. Для біохімічних досліджень (сироватка) практично прийнятним є інтервал 2 год між взяттям крові та центрифугуванням. Кров має знаходитися в закритих пробірках, кришки з пробірок перед центрифугуванням не знімають.

Перед проведенням центрифугування перевіряють, чи всі пробірки, склянки для них, вкладиші однакові за вагою, формою та величиною. Це робиться для того, щоб «плечі» ротора центрифуги були врівноважені. Якщо кількість крові в пробірках різна, то підбирають однакові пари пробірок і кожну з них встановлюють у протилежні симетричні гнізда ротора центрифуги. Для

дотримання симетрії можна використовувати пробірку з необхідною кількістю води у протилежному гнізді.

Об'єми, які можна центрифугувати, варіюють залежно від моделі центрифуги та конструкції її ротора. При виборі оптимальних умов центрифугування необхідно орієнтуватися на відцентрову силу ( $g$ ), а не швидкість обертання ротора (оборотів в хвилину). До паспорта центрифуги має бути додана таблиця (номограма), що визначає залежність між числом оборотів та величиною відцентрової сили конкретного ротора.

**Дистиляція.** Вода для лабораторних досліджень має бути без домішок, її якості багато в чому залежать результати багатьох біохімічних тестів. У лабораторіях використовується кілька категорій води за якістю очищення.

*Дистильована вода* - вода, отримана шляхом випарювання та подальшої конденсації (перегнана вода), вона характеризується стерильністю, очищенням від нерозчинних частинок, але поганим очищенням від розчинених іонізованих катіонів та аніонів. Дистильована вода є апірогенною, тобто. не містить збудників, тому при внутрішньовенному введенні розчинів, приготованих на цій воді, не може виникнути лихоманки. У ній зберігаються такі іонізуючі домішки як аміак,  $CO_2$  та  $Cl$ . Дистильована вода має, як правило, опір 0,25-0,35 мг-см або питому електропровідність 3-4 мкS/см (S - симменс). Для приготування реактивів для клінічної біохімії може бути використана вода із провідністю менше 20 мкS/см. Через розчинену вуглекислоту дистильована вода має слабокисле середовище, її рН становить 5,4-6,6. Майже всі газоподібні речовини здатні тією чи іншою мірою розчинятися у воді чи органічних розчинниках. Деякі їх, наприклад  $NH_3$ ,  $HCl$ , жадібно поглинаються водою. Інші ж гази (кисень, водень) мають меншу або незначну розчинність у воді, причому вона залежить від температури води і зовнішнього тиску. Чим вищий парціальний тиск газу, тим більше він розчиняється у воді, і чим вища температура води, тим менша розчинність газів. Тому воду для видалення розчинених у ній газів кип'ятять. Для отримання повністю нейтральної води її кип'ятять до видалення вуглекислого газу (протягом 30 хвилин) і зберігають у герметичній тарі.



*Бідистильована вода* – двічі очищена вода, отримана перегонкою дистильованої води у кварцовому апараті – бідистилляторі, близька до хімічно чистої води. Бідистильована вода характеризується підвищеною хімічною активністю; при зберіганні та застосуванні слід вживати особливих методів обережності для виключення можливості забруднення бідистильованої води

*Фільтрована вода* - вода, отримана шляхом фільтрації через керамічні фільтри з діаметром пор 0,9 мкм. Така вода очищається майже від нерозчинних домішок і бактерій, але містить солі і віруси, тобто. є пірогенної. У лабораторіях можна застосовувати для приготування барвників.

*Деіонізована вода* - вода, отримана методами іонного обміну, зворотного осмосу або комбінацією цих способів. Така вода має провідність не більше 5 мкS/см та рекомендується для аналітичних робіт з клінічної біохімії. Деіонізована вода практично не містить іонів. Абсолютно чиста вода має провідність 0,055 мкS/см і відповідно питомий опір становить 18 МОм/см (МΩ-см). Деіонізацію здійснюють за допомогою іонообмінних смол. Використовують смоли двох типів: катіонітні RH (R-органічний радикал) та аніонітні R-OH. Іони металів зв'язуються на катіоніті. Негативні іони кислотних залишків осідають на аніоніті. Іони H і OH, що утворилися, об'єднуються в молекулу води. Можливе попереднє використання процесу зворотного осмосу. Для роздавлення біопроб та реактивів краще використовувати деіонізовану воду, отриману методами іонного обміну та зворотного осмосу.

***Техніка приготування розчинів.*** Хімічні реактиви випускаються промисловістю з різним ступенем очищення. У клінічних лабораторіях застосовують реактиви, в основному, наступних чотирьох типів кваліфікації чистоти:

*Технічний* – на етикетці позначається літерою «Т», містить значну кількість домішок, до виконання аналізів непридатний. Використовується лише для підсобних цілей. Наприклад, технічна сірчана кислота застосовується для виготовлення хромової суміші.

*Чистий* - має до 0,1% домішок, на етикетці позначається буквою "Ч". Чистий для аналізу – вміст домішок вбирається у 0,07%. На етикетці позначається літерами «ЧДА».

*Хімічно чистий* – містить домішки трохи більше 0,03%. На етикетці позначається літерами ХЧ. Останні три типи чистих реактивів використовуються для проведення біохімічного аналізу.

**Розчинники** слід використовувати лише чисті незалежно від того, які точно готують розчини. Якщо розчинником служить вода, можна застосовувати лише дистильовану або деіонізовану воду, в окремих випадках бідистиллят.

**Лабораторний посуд** має бути чистим. Попередньо готують відповідної ємності посуд, в якому будуть готувати і зберігати одержуваний розчин. Якщо потрібно приготувати 1 л розчину, для розчинення слід взяти посуд ємністю не більше 1,5 л. Якщо готують 10 л розчину, то сулія повинна бути ємністю не більше 12-13 л. При особливо точних і відповідальних аналізах слід обов'язково брати до уваги можливість вилугування скла і застосовувати, якщо це припустимо, кварцовий посуд або такий, скло якого не містило б елемент, що шукається. Так, неминуча помилка щодо алюмінію, свинцю та деяких інших елементів у посуді зі скла, що містить ці елементи.

Весь посуд, що контактував з кров'ю, піддається очищенню від залишків матеріалу і дезінфікується відповідно до чинних правил санепідрезиму. Зазвичай хороше очищення досягається вже після замочування посуду в комплексному миючому розчині. Потім посуд промивається проточною водою та обполіскується дистильованою водою. З добре вимитого посуду вода стікає цівками, не затримуючись у вигляді крапель. Після сушіння вона абсолютно прозора і не має патьоків. Висушують посуд у сухожарових шафах. Можна сушити і будь-яких пристосуваннях, де забезпечується вільний відтік води з посуду.

У лабораторіях зручно користуватися посудомийними машинами, в яких використовується ультразвукове очищення поверхонь. Якщо в забрудненому посуді був або міг бути інфікований біологічний матеріал, він перед тим, як

закладатися в мийну машину, повинен бути стерилізований згідно з санітарними правилами роботи з відповідним матеріалом. Лабораторна посудомийна машина має ванну з кришкою, зазвичай об'ємом 3-10 л, в яку заливають мийний розчин і кладуть посуд, обробляється ультразвуком при температурі до 60°C, після чого промивається чистою водою.

Працюючи на сучасних лабораторних аналізаторах використовується разові пробірки, миття яких передбачається. Вони дезінфікуються та знищуються згідно з діючими санітарними нормами, як правило, спеціалізованими компаніями за прописаною технологією.

**Розчини** лужні не можна залишати надовго у порцеляновому та особливо у скляному посуді. Якщо доводиться їх залишати, необхідно спочатку нейтралізувати розчини, потім трохи підкислити і зберігати тільки підкислені розчини. Швидкість розчинення твердої речовини залежить від розміру її частинок. Чим більші частки, тим повільніше йде розчинення. Тому перед розчиненням твердої речовини його слід подрібнити та відважувати для розчинення лише подрібнену речовину. Сказане не відноситься до гігроскопічних речовин, так як останні у подрібненому вигляді дуже легко поглинають вологу з повітря внаслідок великого збільшення поверхні. Тому гігроскопічні речовини розчиняють, не подрібнюючи, хіба що швидко розбивши великі шматки.

Деякі правила роботи з реактивами:

1. Ємності з реактивами, що втратили етикетки із зазначенням складу їхнього вмісту, з роботи вилучаються. Це ж стосується реактивів з терміном придатності, що минув.

2. Визначаючи запах реактиву, відповідну ємність тримають з відривом, направляючи себе рухом долоні пари речовини. Це дозволяє запобігти хімічному опіку слизових носа та очей.

3. Готуючи розчини кислот, слід мати на увазі, що кислота додається в останню чергу, тобто наливають кислоту у воду, а не навпаки. Інакше це може

привести до сильного розігріву суміші аж до її закипання та розбризкування кислоти. Особливо це притаманно сірчаної кислоти.

4. Підвищити величину розчинності речовини можна, нагріваючи ємність із розчином на водяній бані. Але це справедливо лише для речовин, розчинення яких протікає із поглинанням тепла. Нагрівати розчини речовин можна лише до певної температури, ніж викликати розкладання речовини.

5. Перед зважуванням реактиви, що зберігалися в холодильнику, повинні бути витримані при кімнатній температурі не менше 20 хвилин.

## **6. МЕТОДИ КЛІНІЧНИХ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

**Фотометричні методи аналізу.** Фотометричний аналіз – один із найпоширеніших методів, він характеризується високою чутливістю та можливістю визначення великої кількості речовин. При фотометричному аналізі використовують здатність хімічних сполук поглинати променисту енергію певних довжин хвиль. Відкриття нових реагентів, що утворюють пофарбовані сполуки з речовинами, розробка принципів поєднаних реакцій, оснащення лабораторій біохімічними аналізаторами робить застосування цього методу одним із найпоширеніших КДЛ. Інструментальні методи дозволяють використовувати спектри поглинання, що лежать як у ультрафіолетової, і в інфрачервоній областях спектра. Фотометричні дослідження проводяться на фотометрах та спектрофотометрах. Фотометри – оптичні прилади, що дозволяють вимірювати світловий потік на фіксованих довжинах хвиль. Суцільні спектри вивчаються за допомогою спектрофотометрів.

**Абсорбційна фотометрія.** Визначення концентрації пофарбованої речовини в розчині оптичними методами ґрунтується на законі Бугера-Лаберта-Бера, який формулює вираз для оптичної щільності:  $D=C \cdot l \cdot \epsilon_{\lambda}$ , де  $D$  – оптична щільність розчину або абсорбція,  $C$  – концентрація поглинаючої речовини,  $l$  – товщина кювети, через який проходить світло,  $\epsilon_{\lambda}$  – молярний показник поглинання (екстинкції), що залежить від довжини хвилі та природи речовини.

Молярний показник поглинання є константою даного розчину речовини за даної довжини хвилі оптичного випромінювання. Величина оптичної густини  $D$

безрозмірна, але може обчислюватися в «белах» (Скорочення - Б). Таким чином, закон Бугера-Ламберта-Бера встановлює, що абсорбція світлового потоку певної довжини хвилі ( $A_\lambda$ ) прямо пропорційна концентрації розчиненої речовини. У кюветі з фіксованою довжиною оптичного шляху (у клінічній хімії прийнята стандартна кювета в 1 см) абсорбція та концентрація пов'язані через коефіцієнт молярної абсорбції. Для кожної речовини характерний свій спектр поглинання, причому він часто різний для окислених та відновлених форм. На зміні спектра поглинання при переході окислена  $\leftrightarrow$  відновлена форма аналітів засновано визначення концентрації більшості субстратів та активності майже всіх ферментів. Дослідження аналітів рекомендується проводити при довжині хвилі опромінення, що відповідає максимальному поглинанню, тобто довжині хвилі, за якої максимальний коефіцієнт молярної екстинкції  $\epsilon$ . Це з тим, що з максимальному  $\epsilon$  максимальна чутливість фотометричного визначення змін концентрації аналіту.

Пряма пропорційність між абсорбцією та концентрацією зберігається в межах певного оптичного діапазону, що є характеристикою конкретного оптичного приладу. Лінійний оптичний діапазон приладу встановлюється експериментально (наводиться у технічних характеристиках приладу). У сучасних фотометрах та біохімічних аналізаторах лінійний оптичний діапазон становить від 0,1 до 2,5 і навіть 3,0 од. оптичної густини.

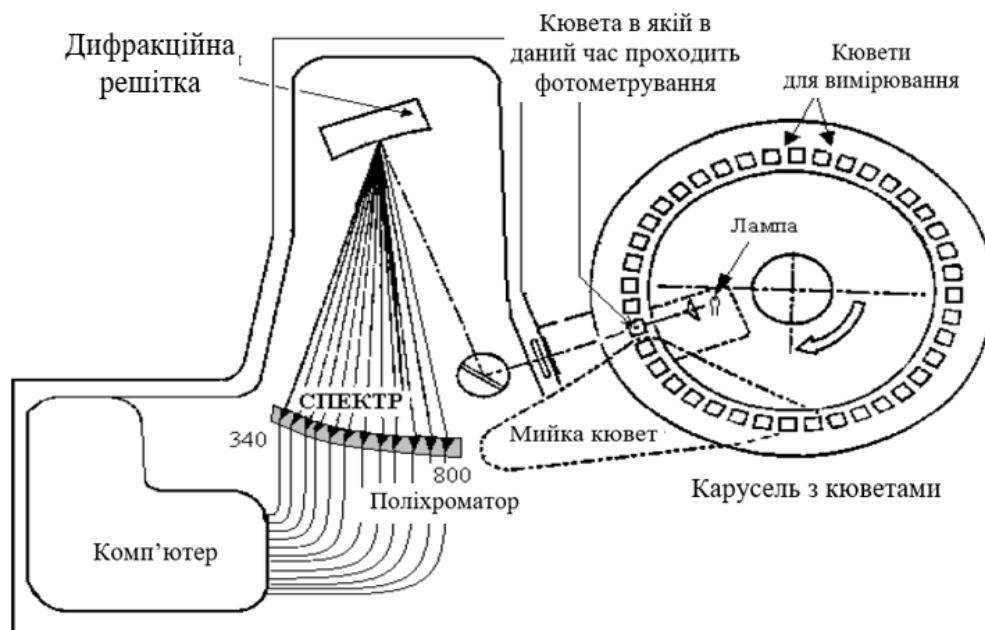
*Роздільна здатність* або чутливість оптичної системи – це мінімальна різниця в оптичній щільності розчину в кюветі в 1 см, яку може розрізнити прилад. Сучасні фотометри дозволяють вимірювати розчини з роздільною здатністю до 0,001 од. оптичної густини. Чим вище роздільна здатність, тим більшою точністю дана система здатна вимірювати концентрацію (активність) аналітів. Роздільна здатність залежить від абсолютного значення оптичної щільності. Поза лінійним діапазоном оптичної щільності ( $< 0,1$  або  $> 3$  од. оптичної щільності) роздільна здатність погіршується.

Обмеження діапазону оптичної щільності накладають відповідні обмеження на діапазон вимірюваних концентрацій аналітів. Результатом цього є те, що

абсорбційна фотометрія надійно реєструє зміни вмісту аналітів у межах 1-2 порядків та не більше. Цього достатньо визначення змін концентрацій основних біохімічних показників, таких як загальний білок, білірубін, глюкоза і змін активностей ферментів амінотрансфераз, фосфатаз, дегідрогеназ. Загалом – це скринінгові показники «біохімічного благополуччя» або «біохімічної патології». Проте кількісні зміни конкретних метаболітів (гормони, онкомаркери, компоненти протеолітичних систем), визначення яких діагностує нозологічне захворювання, методами абсорбційної фотометрії визначити не вдається. З цією метою застосовуються імунохімічні методи.

***Особливості фотометричної схеми біохімічних аналізаторів*** Основою функціонування біохімічного аналізатора є одночасне одержання багатопараметричної інформації. Для цього біохімічні аналізатори оснащені, як правило, поліхроматором (мал. 1), що дозволяє одночасно реєструвати оптичну щільність досліджуваних розчинів на декількох довжинах хвиль.

Джерело світла (лампа) знаходиться всередині каруселі з вимірювальними кюветами, які містять проби для вимірювання. Карусель через фіксовані проміжки часу, наприклад, через 15 с, здійснює оборот, при якому всі кювети висвітлюються білим світлом, що проходить через вхідну щілину. Світло, що пройшло через кювету, розкладається на дифракційній решітці в спектр і вимірюється серією детекторів, кожен з яких налаштований на певну довжину спектра, включаючи вимірювання в ультрафіолеті та ближньому інфрачервоному діапазоні (поліхроматор). Для монохроматичних вимірювань оцінюється сигнал із одного з 12 детекторів, а при біхроматичному вимірі беруться одночасно результати з 2 детекторів. Біхроматичний вимір дає стійкіші результати, оскільки можна компенсувати флуктуацію в умовах вимірювання, таких як напруга джерела живлення, температура та ін.



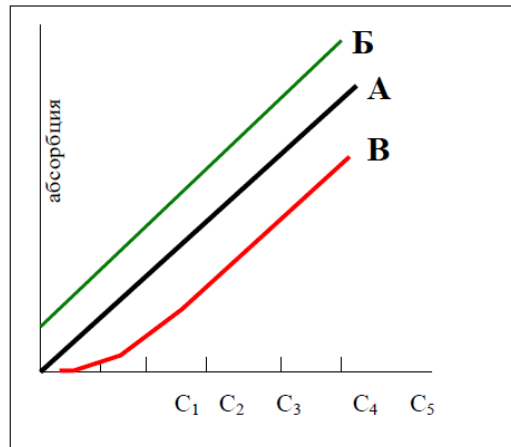
Мал. 1. Принципова схема основних вузлів фотометричного блоку біохімічного аналізатора. Використання одночасно 12 фотодіодів, що реєструють одночасно сигнали різних частин спектру, є основним компонентом поліхроматора

Комп'ютер аналізує результати вимірювань, репрезентує результати в кінцевому вигляді, крім того, комп'ютер через відповідні датчики контролює роботу практично всіх вузлів аналізатора.

Таким чином, в біохімічних аналізаторах вимірюються багаторазово численні кювети з пробами за декількома спектральними характеристиками, а комп'ютер за заданою програмою вибирає необхідні сигнали і на основі їх аналізу розраховує концентрацію або активність аналітів.

**Фотометричні методи визначення аналітів.** Вимірювання по калібрувальної кривої .

Для побудови калібрувальних графіків використовують кілька концентрацій визначуваної речовини, виготовленої як калібратора з різним рівнем концентрації, визначеної точним референтним способом. На осі абсцис відкладається концентрація, але в осі ординат – абсорбція. Якщо закон світлопоглинання дотримується, графік буде мати вигляд прямої лінії, що проходить через нульову точку (мал. 2, графік А).



Мал. 2. Варіанти при побудові калібрувального графіка при лінійній залежності екстинкції від концентрації досліджуваної речовини:

А – закон Бугера-Ламберта-Бера дотримується, пряма виходить із нульової точки, правильний варіант калібрувального графіка

Б – має місце вплив систематичного фактора, бажано вимір порівняно з холостою пробую, в якій цей фактор враховувався б.

В – вимір неправильний, низькі концентрації речовини не вимірюються

Можливі варіанти при побудові калібрувального графіка. Якщо виходить графік Б (див. мал. 2), то використовувати його можна, але є систематичний зсув, який необхідно враховувати під час розрахунку фактор А. Якщо виходить графік, то користуватися ним не можна, так як не визначаються з цього графіку низькі концентрації калібратора. Розрахунки за калібрувальними графіками зазвичай використовують для методів, за яких є стабільні результати день у день (гемоглобін, загальний білок). Працюючи на сучасних аналізаторах оператору фактично доводиться проводити калібрування щодня, при цьому побудова та використання графіків здійснюється автоматично. Для кожного приладу необхідно проводити своє калібрування.

**Метод порівняння стандартного та дослідного зразка.** Цей метод визначення концентрації є найбільш прийнятним, оскільки аналізована та калібрувальна проби обробляються в однакових умовах. Тому при великих серіях досліджень калібрувальну пробу рекомендують досліджувати на початку серії та приблизно через кожні 20 аналізованих проб, визначаючи відношення  $C_{cm}/A_{cm}$  або фактор (F).



Розрахунок за стандартом позначається у тому випадку, якщо використовується рівняння  $C_i = A_i \cdot C_{cm} / A_{cm}$

Розрахунок за чинником – це випадок, коли використовується рівняння  $C = A \cdot F$ .

Слід пам'ятати, що у дослідній та стандартній пробах має оброблятися однаковий обсяг зразка. Даний метод розрахунку справедливий лише на лінійному діапазоні залежності абсорбції від концентрації.

**Вимірювання по кінцевій точці (end point method).** Реакція, що супроводжується зміною фотометричного сигналу, розвивається за деякий період часу і досягає певного кінцевого стану так званої кінцевої точки. Зміна сигналу як функція часу представлено на мал. 3. При вимірюванні кінцевої точки рівень сигналу відповідає кількості продуктів реакції в інкубаційному середовищі після фіксованого часу інкубації. Абсорбція вимірюється після закінчення реакції при стабільному значенні сигналу.

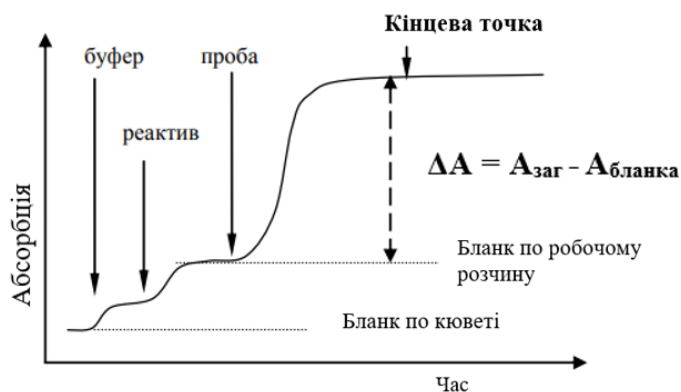


Рис. 3. Вимірювання по кінцевій точці. Стрілками показані моменти внесення буфера, реактиву і біологічної проби, в якості якої може бути сироватка, плазма, сеча та інша біологічна рідина.

Для виключення систематичного впливу результати вимірювання зовнішніх чинників (поза проби), зокрема буфера, реактиву використовують схему з виміром бланка. Як правило, бланк визначається за готовим до вживання реактиву. Абсорбція проби ( $A_{проби}$ ) розраховується за співвідношенням проби кінцевої точки бланка  $A_{проби} = A_{кінцевої\ точки} - A_{бланка}$

При вимірі по кінцевій точці з бланком рекомендується складати робочу таблицю. Прикладом може бути табл. 1, складена для визначення аналіту з використанням стандартного розчину

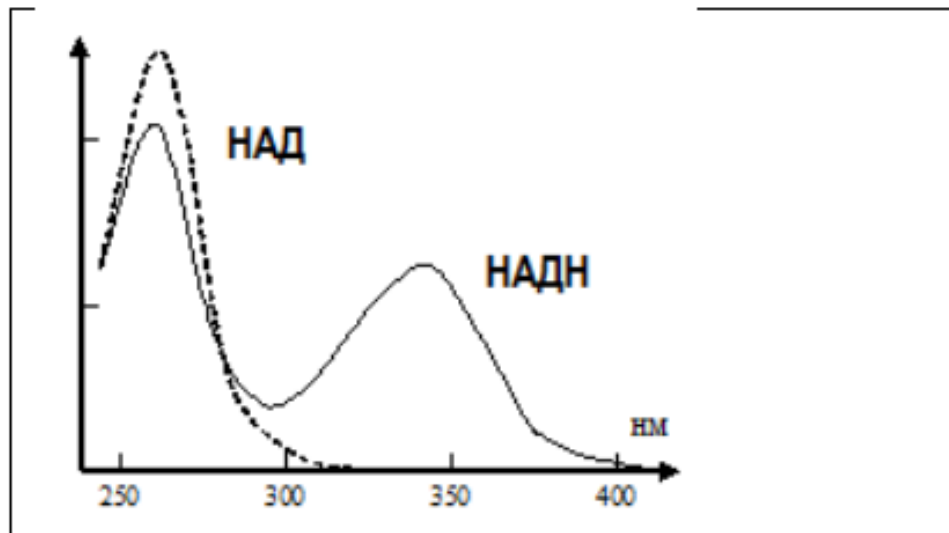
**Вимірювання швидкості зміни абсорбції.** У клінічній біохімії фотометричні виміри в більшості випадків проводяться безпосередньо при протіканні біохімічних реакцій у процесі яких споживаються субстрати, підвищуються продукти реакцій або змінюються ко-фактори реакцій.

Тест Варбурга (УФ-тест) є одним із найпоширеніших оптичних тестів Тест Варбурга заснований на тому, що один із продуктів дегідрогеназної реакції - відновлена форма нікотинамідаденіндинуклеотид або його фосфат (НАДН або НАДФН) - має максимум поглинання при довжині хвилі 340 нм, а їх окислені форми за цієї довжини хвилі мало поглинають (Мал. 4). УФ-тест може бути використаний для визначення швидкостей тих реакцій, у яких не беруть участь НАД або НАДФ, але продукти, що утворюються в сполучених ферментативних реакціях призводять до окислення НАДН або відновлення НАД (непрямий оптичний тест Варбурга).

Таблиця 1

**Робоча таблиця визначення концентрації аналіту методом вимірювання з бланком по робочому реактиву**

	<b>Бланк</b>	<b>Стандарт</b>	<b>Проба</b>
Робочий розчин	1 мл	1 мл	1 мл
Дистильована вода	10 мкл	-	-
Стандарт	-	10 мкл	+
Проба	-	-	10 мкл
Перемішати, виміряти оптичну густина через 5 хв інкубації			
Зміст аналіту в пробі ( $C_{проби}$ ) розраховується за співвідношенням			
$C_{проби} = \frac{A_{проби} - A_{бланка}}{A_{стандарту} - A_{бланка}}$			



Мал. 4. Спектри поглинання НАД<sup>+</sup> і НАДН. відновлення НАД<sup>+</sup> до НАДН простежується при 340 нм – при цій довжині хвилі є максимум поглинання НАДН, а НАД<sup>+</sup> не поглинає світло

При кінетичному визначенні обчислюють зміну екстинкції за 1 хв та розраховують активність за формулою:  $A = \frac{V \times 1000}{\epsilon \times l \times v} \times \frac{\Delta E}{xv}$

де А - активність ферменту, що вимірюється в міжнародних одиницях (МЕ або Од або U), визначається як кількість ферменту, що каталізує перетворення 1 мікромоль (мкмоль) субстрату в 1 хвилину. Каталітична активність ферменту виражається числом одиниць, розрахованих на 1 літра біологічної рідини (Ед/л).

V – об'єм реакційної суміші, мл;

1000 - коефіцієнт перерахунку на 1 л сироватки;

ε – коефіцієнт мілімолярної екстинкції НАДН реакції 6,22 л/(ммоль x см);

l - Довжина оптичного шляху (1 см);

v – обсяг проби (сироватки крові чи іншого матеріалу), мл;

ΔE – зміна екстинкції за 1 хв.

Результат арифметичних обчислень для першого дробу формули є фактором (F). Значення фактора вводиться в програму фотометра або біохімічного аналізатора, в результаті активність ферменту розраховують так:  $A = F \times \Delta E / xv$ . При визначенні активності ферментів з використанням діагностичних наборів відомий використовуваній хромоген (отже, відомий його коефіцієнт молярної екстинкції), встановлені обсяг реакційного середовища та обсяг зразка,

вимірювання проводиться в кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. Тому розрахунок активності ферменту проводиться за фактором (F) , помноженому на  $\Delta E/\text{хв}$ . Фактор наводиться в інструкціях щодо різних температур інкубації. У сучасних програмованих фотометрах та біохімічних аналізаторах всі розрахунки програмуються, і результати виходять у кінцевому вигляді.

### **Імунохімічні фотометричні методи аналізу.**

Імунохімічні методи дослідження – це сукупність діагностичних методів, що ґрунтуються на специфічній взаємодії антигенів та антитіл з утворенням імунних комплексів. Ключовим принципом імунохімічних методів є участь на різних стадіях проведення лабораторного аналізу імуноглобулінів (моно- та поліклональних антитіл) та антигенів, що входять до складу тест-систем для лабораторних досліджень. Один з компонентів реакційної суміші є визначальним речовиною (зразок), інший (компонент імунної системи, що знаходиться у складі реагентів) має специфічність по відношенню до визначуваної речовини і є впізнаючим. На перебіг імунохімічних реакцій впливають загальні неспецифічні умови (лабораторний посуд, якість води), специфічні для даної системи характеристики (властивості та розмір антигену, клас антитіл), а також умови проведення тесту та якість реагентів (середовище реакції, склад реагентів, рН, температура) , характер зв'язку спеціальної мітки з імунним комплексом, що утворився. Сучасні імунохімічні методи здатні у процесі аналізу виявляти як один аналіт (визначати один показник), і кілька діагностичних показників (мультиплексний аналіз).

Залежно від механізму проведення та обліку результатів реакції утворення імунних комплексів, імунохімічні методи дослідження поділяють:

- Методи без використання спеціальних міток виявлення результату. До імунохімічних методів без використання спеціальних міток відносять методи турбідиметрії та нефелометрії.

- Імунохімічні методи із застосуванням спеціальних міток виявлення результату. Завдяки високій чутливості та специфічності, ці методи широко застосовуються в клінічній лабораторній діагностиці. Залежно від типу мітки

виділяють: імуноферментний аналіз (ІФА), імунофлюоресценцію (ІФО), імунохемілюмінісценцію (ІХЛ), радіоімунний аналіз (РІА).

**Турбідиметрія та нефелометрія.** Якщо помістити каламутний розчин у кювету фотометричного приладу, то світловий потік, проходячи через кювету, поглинатиметься, частково проходить через кювету, не змінюючи напрямки (трансмісія), частково розсіюватися, відхиляючись під різними кутами. Трансмісія та розсіювання світла залежать від довжини хвилі світлового потоку, його частоти, інтенсивності, а також від властивості розсіювального середовища: розміру частинок, їх форми, кількості, здатності до поляризації.

Якщо в процесі вимірювання розмір частинок в розчині буде змінюватися (наприклад, в результаті взаємодії антиген-антитіло), то відповідно змінюватиметься потік проходить і інтенсивність розсіяного світла. Методи турбідиметрії та нефелометрії можна автоматизувати, що уможливорює отримання результату аналізу протягом декількох хвилин.

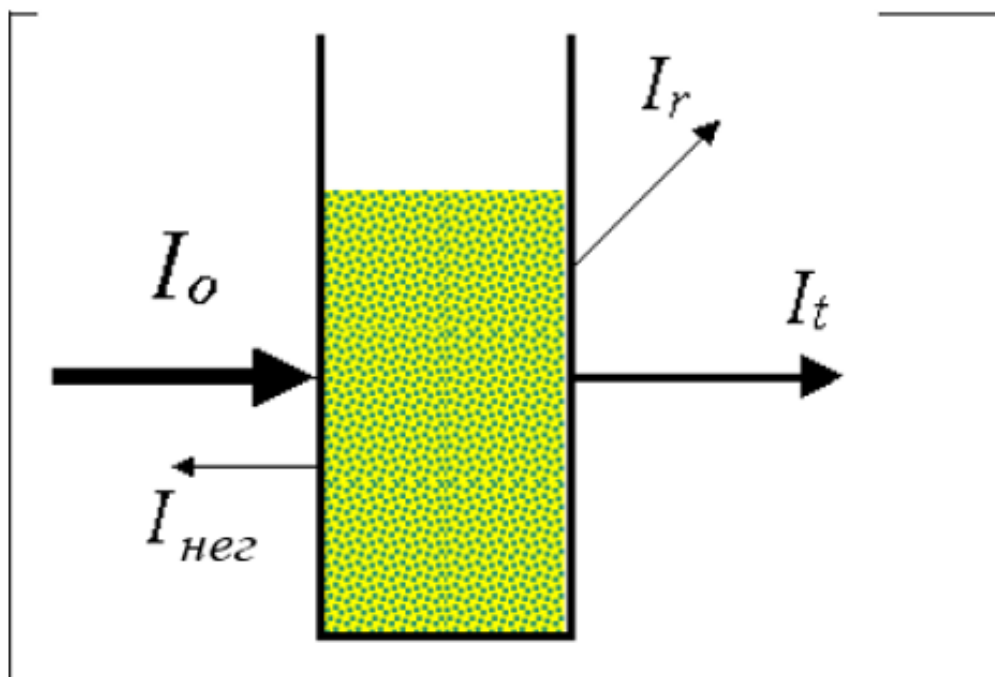
Нефелометрія і турбідиметрія – методи кількісного імунохімічного аналізу, засновані на вимірі інтенсивності світла, розсіяного дисперсною системою ( $I_r$ ) (нефелометрія) або пройшов через неї (турбідиметрія) ( $I_t$ ) (Мал. 5).

**Турбідиметрія** – вимір потоку світлового пучка, що пройшов через кювету. Як турбідиметр можна використовувати більшість фотометрів і біохімічних аналізаторів, в яких є можливість побудови нелінійної калібрувальної кривої. Закон Бугера-Ламберта-Бера для минулого потоку записується:  $I_t = I_o \times 10^{-tC}$ , де  $t$  - молярний коефіцієнт каламутності розчину або турбідиметрія,  $I_o$  - інтенсивність падаючого на кювету світла,  $C$  - концентрація досліджуваної речовини.

Таким чином, інтенсивність пучка (щільність потоку) паралельних променів світла при проходженні через кювету змінюється за експонентним законом.

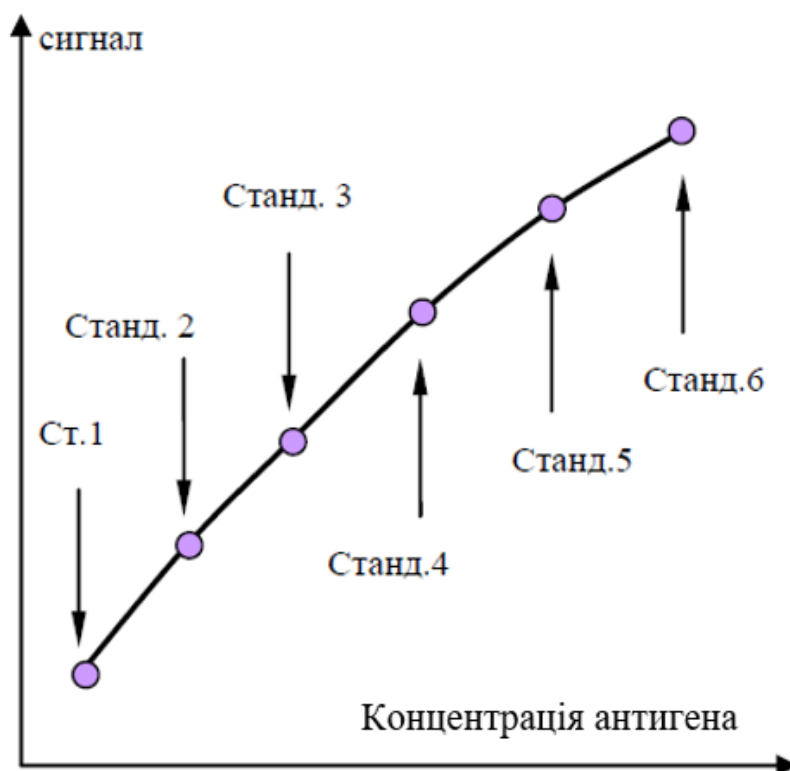
Турбідиметрія застосовується для аналізу суспензій, суспензій та інших каламутних середовищ. У клініко-лабораторній практиці використовують імунотурбідиметричні дослідження, засновані на реєстрації утворення імунних комплексів антиген-антитіло, що супроводжуються утворенням відповідного

преципітату, для підвищення каламутності застосовують латексні частинки, на які сорбують антитіла.



Мал. 5. Схема нефелометрії та турбідиметрії. Турбідиметрія – вимірювання світлового потоку через каламутний розчин ( $I_t$ ), нефелометрія – вимірювання розсіяного світла, яке може реєструватися під різними кутами ( $I_r$ )

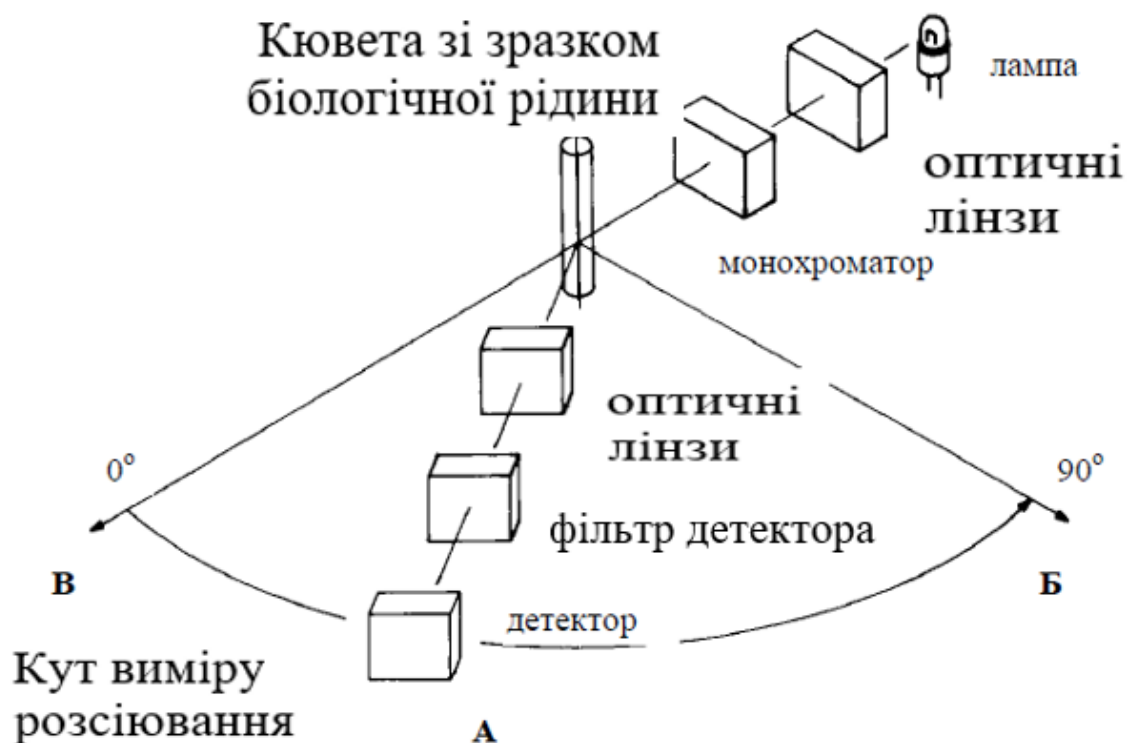
Особливістю турбідиметричних визначень є побудова калібрувального графіка з використанням не менше п'яти концентрацій, оскільки калібрувальний графік має нелінійний характер. Калібрувальний графік (стандартна крива, мал.6) будується для кожного аналіта, для кожного приладу, за будь-якої зміни умов реєстрації та періодично в міру проведення досліджень. При серійних дослідженнях у стандартних умовах допускається коригування кривої на підставі виміру одного із стандартів. Це ґрунтується на спостереженні про те, що характерний вид стандартної кривої не змінюється через вплив систематичних факторів, а відбувається паралельний зсув усієї кривої. У цих випадках роблять перерахунок кривої, так, щоб вона йшла паралельно до первинної кривої, але проходила б через нову точку. Для побудови стандартної кривої використовуються стандарти, які постачаються у складі відповідного тест-набору.



Мал. 6. Стандартна крива, характерна визначення індивідуальних білків турбидиметрическим і нефелометричним методами. Для побудови кривої потрібно принаймні 5 стандартних розчинів антигену.

**Нефелометрія** - вимірювання розсіяного світла, що дозволяє визначати характер і концентрацію частинок, що розсіюють. Нефелометр – прилад, що вимірює розсіяне світло. На мал. 7 представлена важлива схема нефелометра. Вимір світлорозсіювання під різними кутами (як правило, використовуються вимірювання малокутового розсіювання) дає інформацію про розміри частинок у розчині. Якщо відомі розміри частинок речовини, що розсіює, то можливо за інтенсивністю розсіяного світла при фіксованому вугіллі вимірювання визначити концентрацію речовини. Методи, засновані на взаємодії антиген-антитіло, є високоспецифічними, тому практично у всіх випадках відомо, що вимірюється. Виходячи з цього, прилади для нефелометрії програмуються під вимірювання певних специфічних компонентів біологічної рідини, інтенсивність розсіяного світла в цьому випадку відображає кількість (концентрацію) антигену, що досліджується. У нефелометр часто використовують лазерні джерела випромінювання. Лазер має високу інтенсивність випромінювання,

строгу спрямованість випромінювання та фіксовану довжину хвилі, тому когерентна природа лазерного променя робить його ідеальним для нефелометричних вимірів.



Мал. 7. Принципова схема нефелометр. А - нефелометр, що реєструє малокутове розсіювання, Б - нефелометр, що реєструє розсіювання під кутом  $90^\circ$ , В – турбідиметр

**Імуноферментний аналіз.** Імуноферментний аналіз (ІФА) – один із найбільш надійних видів імунохімічного аналізу, високочутливий, економічно вигідний метод, що застосовується для якісного та кількісного аналізу антитіл та антигенів. Для виявлення утворюється комплексу антигену і антитіл використовують як мітку фермент або фермент-залежна речовина. Метод характеризується відносною простотою проведення реакції, можливістю приладового обліку результатів та автоматизації всіх етапів аналізу. В основі методу ІФА лежить оцінка результатів імунної реакції антигену з антитілом. Отриманий комплекс визначається наступним чином: реакційну суміш вводиться кон'югат, який включає ферментну мітку, а також додають спеціальний хромогенний субстрат. Фермент, взаємодіючи із субстратом, змінює



його забарвлення. Облік результатів проводять фотометрично. Існує кілька модифікацій методу ІФА

*Гетерогенний (твердофазний) ІФА у мікропланшетному форматі* набув найбільшого поширення у тест-системах для лабораторних досліджень. В якості твердої фази використовується поверхня лунок полістиролового планшета, на яку адсорбовані відомі антигени або антитіла (*імуносорбент*), що входять до складу тест-системи. В ході специфічної реакції імуносорбенту з визначеними у досліджуваному зразку антитілами (АТ) або антигенами (АГ) утворюються імунні комплекси, які виявляються фіксованими на твердій фазі. Субстанції, які не беруть участі в реакції, і надмірна кількість реагентів видаляються при багаторазовому промиванні. За механізмом реакції серед гетерогенних методів розрізняють конкурентний та неконкурентний.

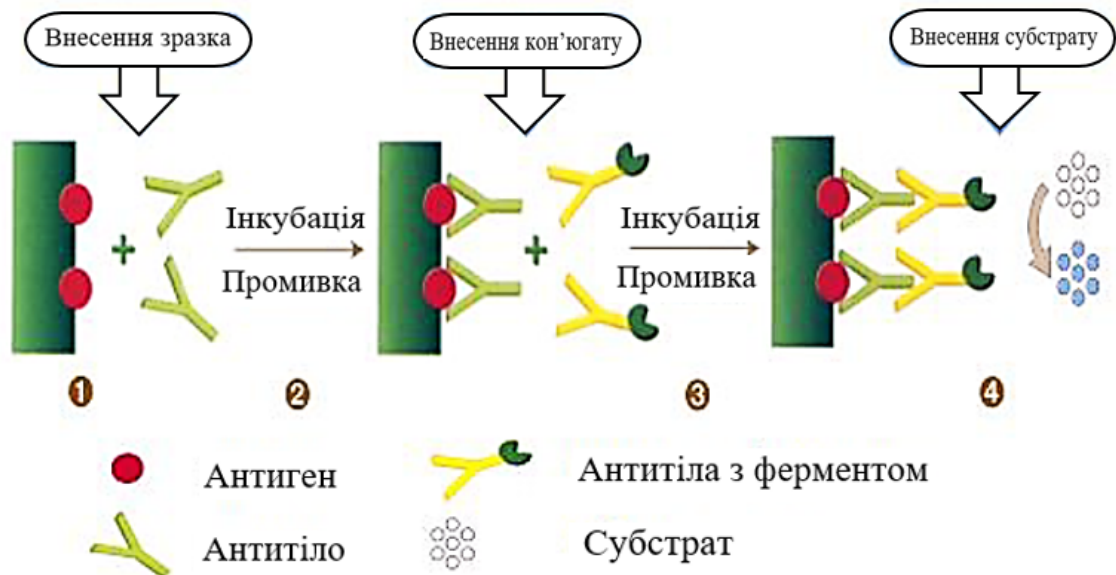
Непрямий неконкурентний гетерогенний ІФА представлений кількома етапами (мал. 8):

1. На твердій поверхні пластикової лунки сорбується антиген (АГ). У лунку вноситься біологічний матеріал, що досліджується, найчастіше сироватка крові пацієнта.

2. Досліджувані антитіла (АТ) під час інкубації зв'язуються з антигеном, сорбованим на планшеті. Білки, що не зв'язалися, видаляють відмиванням.

3. У лунку вносять кон'югат - тобто АТ із заздалегідь прикріпленим до них ферментом, наприклад, пероксидазою, здатні зв'язатися з АТ людини, що закріпилися на імуносорбенті. Якщо в осередку є імунні комплекси, що утворилися на першій стадії процесу, то кон'югат з'єднується з визначеними антитілами під час другої інкубації. Кон'югат, що не зв'язався, залишається в рідкій фазі і видаляється відмиванням.

4. У лунку додається субстратно-хромогенний реагент, який під впливом ферменту кон'югату, що зв'язався з імунними комплексами, перетворюється на забарвлений продукт реакції.



Мал. 8. Етапи неконкурентного ІФА

**"Сендвіч"** - різновид неконкурентного гетерогенного ІФА; метод широко використовується визначення АТ і АГ (мал. 9):

1. На твердій поверхні пластикової лунки сорбовані антитіла (АТ). У лунку вноситься біологічний матеріал, що досліджується, найчастіше сироватка або плазма крові хворого.

2. Досліджувані антигени (АГ) під час інкубації зв'язуються з АТ, сорбованими на планшеті. Незв'язані компоненти видаляють відмиванням.

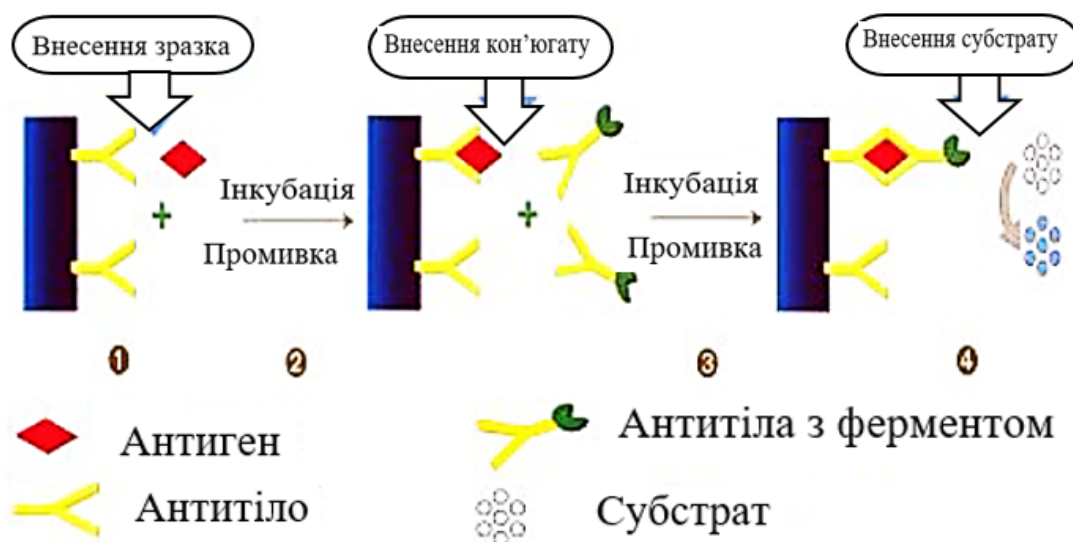
3. У лунку вносять кон'югат, який є антитілами, міченими ферментом. Якщо в осередку є імунні комплекси, що утворилися на першій стадії процесу, то кон'югат з'єднується з визначеними антигенами і утворюється потрійний комплекс – «сендвіч». Частина кон'югату, що не зв'язалася, залишається в рідкій фазі і видаляється відмиванням.

4. У лунку додається субстратно-хромогенний реагент, який під впливом ферменту кон'югату перетворюється на забарвлений продукт реакції.

Кількість антигенів, що тестуються, оцінюють за вмістом забарвленого продукту реакції, будують калібрувальну залежність і проводять визначення концентрації антигенів, що тестуються, у зразках пацієнтів. Концентрація

визначається речовини прямо пропорційна інтенсивності забарвлення проби і, отже, оптичної щільності.

За аналогічною схемою працюють тест-системи для визначення АТ, але як імуносорбент в них використовуються АГ, а кон'югат містить розчин АГ, мічених ферментом.

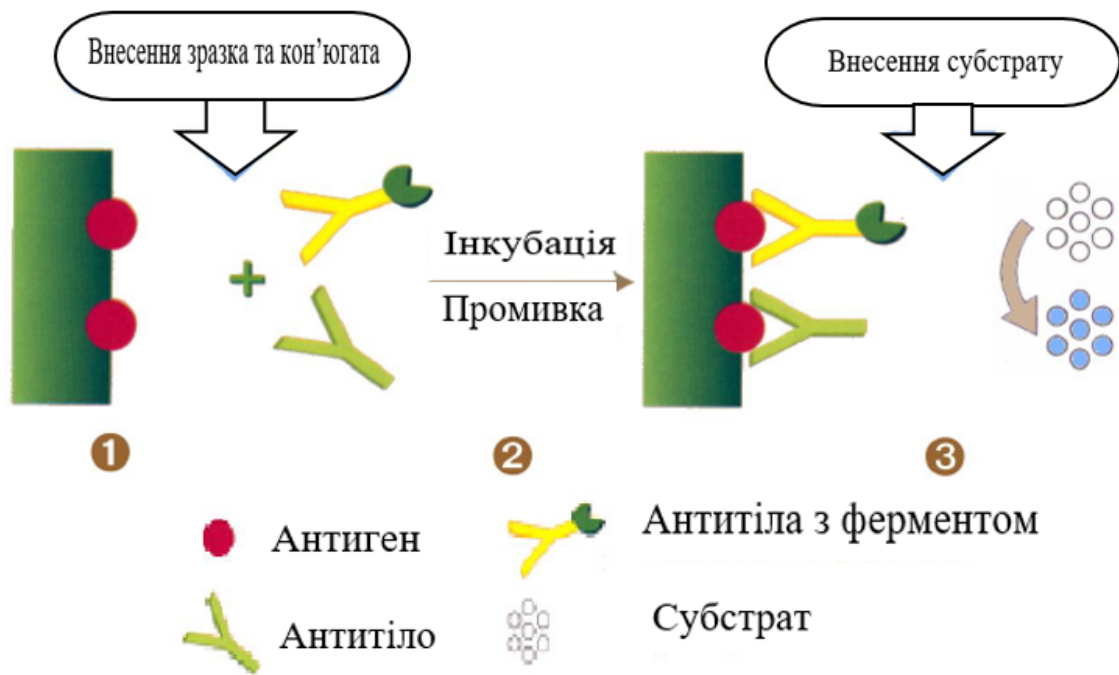


Мал. 9. "Сендвіч". Послідовність аналізу

Тест-системи з використанням стрептавідину та біотинілованих моноклональних антитіл набули поширення для посилення аналітичних характеристик тест-систем. У цьому випадку стандарти, контролю та проби пацієнтів спочатку додаються до мікроосередків, покритих стрептавідином. Потім додають біотиніловані АТ (це суміш високоочищених специфічних моноклональних АТ до різних епітопів), фермент-мічені АТ (кон'югат), і реагенти перемішуються. Результатом реакції між різними антитілами та обумовленим антигеном стає утворення «сендвіч»-комплексу, який зв'язується зі стрептавідином у осередках. Незв'язані компоненти видаляються промиванням. Особливістю таких систем є віддалення ферментної реакції від стінки планшета, тому забарвлення розвивається в обсязі і тест-система стає більш чутливою.

Конкурентний гетерогенний імуноферментний аналіз схематично представлений на мал. 10. У цьому випадку АГ або АТ пацієнта, що

визначаються АГ, конкурують з аналогічними міченими АГ або АТ кон'югату за місця зв'язування з імуносорбентом.



Мал. 10. Конкурентний імуноаналіз

**Послідовність аналізу:**

1. На поверхні планшета сорбовано АГ. У лунку вносять досліджувану сироватку або плазму пацієнта і кон'югат, який являє собою антитіла, мічені ферментом.

2. У ході інкубації АТ пацієнта конкурують із міченими АТ кон'югату за місця зв'язування з імуносорбентом, в результаті утворюються імунні комплекси двох видів: що містять ферментну мітку (мічені) і без неї (німецькі). Чим більше визначених антитіл містить зразок пацієнта, тим менше утворюється мічених імунних комплексів. Кон'югат, що не зв'язався, залишається в рідкій фазі і видаляється відмиванням.

3. У лунку додається безбарвний субстратно-хромогенний реагент, який під впливом ферменту перетворюється на забарвлений продукт реакції. При конкурентному варіанті концентрація обумовленої речовини обернено пропорційна оптичній щільності. Аналіз цього часто використовують для

визначення антигенів, присутніх у високих концентраціях, або гормонів, які мають тільки один антигензв'язуючий центр.

Якісний аналіз часто використовується при проведенні скринінгових досліджень та діагностики інфекційних захворювань. Як правило, для діагностики інфекцій використовуються два види серологічних реакцій:

1. Виявлення патоген-специфічних антитіл у сироватці крові обстежуваного;

Встановлення родової та видової приналежності мікроорганізму чи вірусу. В даному випадку невідомим компонентом реакції є антиген. Таке дослідження вимагає постановки реакції із відомими імунними сироватками.

Люмінесценція. Люмінесценція – це випромінювання світла молекулами. У процесі люмінесценції відбувається віддача енергії. Прикладом природної люмінесценції є свічення термофільних рослин поблизу гейзерів. Люмінесценція може відбуватися під час передачі енергії у різних процесах. У медичній лабораторній практиці найширше знайшло застосування флуоресценція – світло після опромінення ультрафіолетовим або видимим світлом, та хемілюмінесценція – випромінювання внаслідок хімічної реакції.

**Флуоресценція** отримала свою назву від природного мінералу – флюориту  $\text{CaF}_2$ , який вперше спостерігав цей тип світіння. Розрізняють **фосфоресценцію** – свічення, що триває відносно довго після припинення впливу, та **флуоресценцію** – свічення, що відбувається лише під час впливу. Порушення відбувається за більшої енергії, тобто за меншої довжини хвилі, ніж вторинне світіння. Тому при флуоресценції довжина хвилі світіння більша, ніж довжина хвилі збудження. В аналітичних цілях у тест-системах як позначки при проведенні флюоресцентного аналізу часто використовуються флюорофори. У клінічній лабораторній діагностиці широко застосовують різні модифікації методу імунофлюоресценції.

**Імунохемілюмінісценція.** Хемілюмінесценція – випромінювання світла молекулами, що перейшли у збуджений стан у результаті хімічної реакції. Найчастіше це явище спостерігається при окисненні органічних речовин

перекисом водню, гіпохлоритом, молекулярним киснем. У *люмінометрах* характерною особливістю є джерела світла, світіння зразка індукується хімічної реакцією.

Принцип хемілюмінесцентної детекції реалізується у випадках методик імунохімічних досліджень. Хемілюмінесцентна детекція має високу специфічність, не вимагає тривалих інкубацій або додавання стоп реагенту, не використовує додаткових джерел світла. Хемілюмінесценція в даний час активно використовується в КДЛ та науковій практиці для виявлення мінімальних кількостей аналітів у біопробах. До складу реакційної суміші при реакції імунохемілюмінесценції (ІХЛ) входять: мічені антитіла або антигени та суміш: хемілюмінесцентний субстрат, перекис водню та підсилювачі реакції. Як останні застосовуються ароматичні аміни, нафтоли, феноли. Імунохімічні аналізатори, розроблені для реєстрації ІХЛ, мають високу продуктивність і здатність проводити аналіз в автоматичному режимі. До безперечних переваг імунохемілюмінесцентного методу віднесуться:

- Висока автоматизація та стандартизація аналітичного процесу.
- Висока аналітична чутливість та специфічність.
- Тривала стабільність реагентів.
- Можливість дослідження поодиноких проб.

***Порівняльна характеристика фотометричних методів.*** У клінічній хімії досить часто постає питання про вибір технології визначення тієї чи іншої групи аналітів. Наприклад, визначення гормонів можна проводити методом абсорційної фотометрії за технологією ІФА-аналізу, можна турбідиметрією та нефелометрією, можна скористатися технологіями, заснованими на використанні флюоресцентної або люмінесцентної мітки. Основним недоліком абсорційної фотометрії є вузький лінійний діапазон вимірювання результатів. Навіть найкращі фотометри дозволяють реєструвати зміни аналітів (гормонів) не більше ніж у межах 4 десяткових порядків. Флюоресцентні та люмінесцентні технології збільшують лінійний діапазон до 6-8 десяткових порядків, тобто дозволяють працювати без розведення. Флюоресцентні та люмінесцентні

технології дозволяють суттєво збільшити чутливість визначення речовин у біопробах, проте вони використовуються, як правило, у закритих технологіях, що включають прилад-реактиви-калібратори-контрольні матеріали.

Аналітичні характеристики, такі як лінійний діапазон і чутливість, визначили, що методи абсорбційної фотометрії, реалізовані біохімічних аналізаторах, застосовуються в основному як скринінгові діагностичні технології, що виявляють системну патологію. Імунохімічні методи, що ґрунтуються на специфічній взаємодії антитіло-антиген, використовуються для виявлення або кількісного визначення конкретних маркерів, які можуть вказати на наявність певного захворювання чи патології. Якісні імунохімічні методи, реалізовані технологією ІФА-аналізу, найчастіше застосовуються при діагностиці інфекційних захворювань, при якому важлива відповідь на питання «є чи ні» зараження, «є чи ні» імунітет до конкретного інфекційного агента. Кількісні імунохімічні методи використовуються визначення концентрації індивідуальних молекул, що дозволяє оцінити ступінь патології, стежити за ефективністю терапії, констатувати лікування. У випадках підвищення мітки, що характеризує патологію, ефективними є менш чутливі імунохімічні технології: імунотурбідиметрія, нефелометрія. Якщо ж кількість мітки знижується або потрібно отримати відтворюваний результат у віддалений період, переважно використовувати імунохемилюмінесцентні технології.

**Мікроскопічні методи. Світлові мікроскопи.** Мікроскопічне дослідження – один із найбільш використовуваних методів у лабораторній гематології, цитології, загальноклінічних дослідженнях. За допомогою мікроскопів об'єкти дослідження розміром від 0,5 мкм з роздільною здатністю елементів до 0,1 мкм можуть бути збільшені більш ніж у 1500 разів. Світлові мікроскопи поділяються на мікроскопи плоского поля (двовимірне зображення) та стереоскопічні (об'ємне зображення). І ті й інші поділяються на мікроскопи світла, що проходить, мікроскопи відбитого світла. Мікроскопи світла плоского поля у вітчизняній практиці називають біологічними.

До основних параметрів мікроскопа відносяться: збільшення, роздільна здатність, лінійне поле на предметі, ступінь виправлення аберацій.

**Збільшення** мікроскопа залежить від збільшення об'єктиву, окуляра, проміжних насадок. Наприклад, у вітчизняному мікроскопі Мікмед 1 монокулярна насадка немає збільшення, тому загальне збільшення з об'єктивом  $100\times$  і окуляром  $10\times$  дорівнюватиме  $1000\times$ . Апертура об'єктива - це максимальний кут, під яким промені, що йдуть від препарату, можуть потрапляти в об'єктив. Числова апертура визначає низку найважливіших властивостей мікроскопа: яскравість зображення, глибину різкого бачення, ступінь подібності зображення з предметом. Збільшення числової апертури підвищує здатність об'єктива відтворювати дрібні деталі об'єкта. Об'єктиви світла, що працюють у повітрі (сухі системи) мають числову апертуру не вище 0,95. Іммерсійні об'єктиви мають числову апертуру до 1,45. Числова апертура об'єктивів маркується на корпусі, наприклад, напис « $40\times/0,95$ » означає, що об'єктив зі збільшенням  $40\times$  і числовою апертурою 0,95.

*Корисне збільшення мікроскопа* має бути не більше 1000 числових апертур об'єктива і не менше 500. Більш високе збільшення або менше не виявляє нових деталей об'єкта в зображенні. Наприклад, для об'єктиву  $100\times$  з числовою апертурою 1,25 корисне збільшення мікроскопа лежить в діапазоні 626-1250 $\times$ . При більшому збільшенні зображення стає нечітким і малоконтрастним, зі зниженою роздільною здатністю. При меншому збільшенні зображення об'єкта, незважаючи на чіткість та підвищений контраст, стає настільки дрібним, що елементи об'єкта практично невиразні.

**Роздільна здатність** – це найменша відстань між зображеннями 2 сусідніх точок (ліній), які розрізняються як 2 окремі зображення.

**Поле на предметі** розраховується з урахуванням лінійного поля окуляра та збільшення об'єктиву, а також додаткових оптичних елементів, які вміють збільшення та розташовані до окуляра всередині мікроскопа. Так мікроскоп Мікмед 1 з об'єктивом  $100\times$  та біноккулярною насадкою, що дає додаткове збільшення  $1,5\times$  має розмір лінійного поля 0,12 мм.



**Аберация** – це спотворення чи відступ у зображенні об'єкта від ідеального. Хроматичні аберації обумовлені різним заломленням світла з різними довжинами хвиль. При цьому утворюються в кожному кольорі окремі зображення, внаслідок чого зображення об'єкта має вигляд «шарованого пирога». Хроматичні аберації усуваються за допомогою підбору стекол марок з урахуванням показника заломлення та дисперсії, технології виготовлення радіусів та інших технологічних прийомів.

### **Особливості мікроскопічних методів при мікробіологічних (бактеріоскопічних), цитологічних дослідженнях.**

*Мікроскопічне дослідження із використанням люмінесцентного мікроскопа.* Люмінесцентні мікроскопи проєктують на об'єкт відображене світло певної довжини хвилі, що змушує частину об'єкта світитися на іншій довжині хвилі. Візуально зображення, сфокусоване люмінесцентним мікроскопом, являє собою об'єкти, що яскраво світяться, на чорному тлі. При мікроскопії можлива візуальна оцінка антигенних структур клітин та тканин, а також мікроорганізмів. При цьому відбувається зв'язування специфічно мічених флуорохромом антитіл з клітинними або тканинними антигенами мікропрепарату, що вивчаються.

Варіанти методу при обліку результатів за допомогою люмінесцентного мікроскопа в різних модифікаціях під різними назвами – реакція імунофлуоресценції (РІФ), прямий імунофлуоресцентний аналіз (ПІФ), метод флуоресцентного аналізу (МФА) широко застосовуються в даний час.

Популярність РІФ пояснюється економічністю, наявністю широкого спектра діагностичних наборів та швидкістю отримання відповіді. Найчастіше РІФ використовують із швидкого виявлення збудника в патологічному матеріалі. У цьому випадку з матеріалу, що досліджується, готують мазок на предметному склі, як для звичайної мікроскопії. Препарат фіксують метиловим спиртом, ацетоном або іншим хімічним фіксатором, що іноді входить до складу діагностичного набору. На поверхню фіксованого мазка наносять мічені флуоресцеїнізоціанатом сироватки або моноклональні антитіла.

Виділяють пряму та непряму імунофлуоресценцію.

*Прямою імунофлуоресценцією* тканинні антигени, інфекційні агенти або відкладення сироваткових білків у тканинах або клітинах виявляються за допомогою мічених флуорохромами антисироваток або моноклональних антитіл. Пряма імунофлуоресценція використовується переважно для морфологічних досліджень біопсій тканини, цитологічних та мікробіологічних досліджень. У діагностиці аутоімунних захворювань метод прямої імунофлуоресценції використовується для виявлення відкладень імуноглобулінів та факторів комплементу у біопсіях шкіри та нирок.

*Непряма імунофлуоресценція* відноситься до тестів, у яких застосовуються для виявлення антигенів флуоресцентномічені антитіла. Кріосрізи тканини, клітини або мікроорганізми використовуються як субстрат, з яким зв'язуються мічені аутоантитіла. У результаті з допомогою люмінесцентного мікроскопа можна описати різні типи свічення. Так антинуклеарні антитіла можуть бути спрямовані як антигенів нуклеохроматину, який дифузно розподілений в ядрі, так і до компонентів ядерця. Щоб розрізнити ці варіанти виявлення антинуклеарних антитіл, поруч із титром антинуклеарного чинника, описується «тип свічення» ядра клітини. Типи свічення можуть бути описані при виявленні антинейтрофільних антитіл, антикератинових антитіл, антимітохондріальних антитіл та багатьох інших. Безперечною перевагою непрямої імунофлуоресценції є можливість оцінки одночасного зв'язування аутоантитіл з усією різноманітністю антигенів, що є в тканинному субстраті. Це робить імунофлуоресценцію зручною для скринінгового використання та зумовлює велике значення цього методу в аутоімунній діагностиці. Можливе проведення всіх стадій імунофлуоресцентного аналізу у повністю автоматичному режимі. Вбудована в мікроскоп камера робить знімки високої роздільної здатності та автоматично зберігає їх у базі даних. Попередня оцінка результатів (позитивний чи негативний) відбувається автоматично.

*Інвертовані мікроскопи.* За розташуванням об'єктиву щодо препарату та джерела світла мікроскопи бувають прямі та інвертовані. Інвертовані мікроскопи світла, що проходить, є «перевернутою» конструкцією звичайного мікроскопа:

освітлювач проходить світла розташований над об'єктивом і має велику робочу відстань, тим самим забезпечується вільний доступ інструменту (маніпулятора, голки, піпетки) до препарату, який знаходиться, наприклад, у чашці Петрі. При застосуванні фозовоконтрастних пристроїв, конденсорів темного поля та косоого освітлення можливе спостереження малококонтрастних препаратів.

*Метод темного поля.* Використовують метод для дослідження малококонтрастних об'єктів, які неможливо пофарбувати. Метод заснований на ефекті, що досягається освітленням об'єкта порожнистим конусом світла, внутрішня апертура якого перевищує числову апертуру об'єктива, що застосовується. У такий спосіб досягається ефект, що жоден прямий промінь не потрапляє в об'єктив (темне поле). За наявності об'єкта спостерігатиметься яскраве блискуче свічення контуру навколо об'єкта на темному тлі у відбитому світлі. Метод застосовується спостереження живих льоток. Мікроорганізмів, прозорих кристалів та інших елементів, коли достатньо спостерігати за контуром.

*Метод фазового контрасту.* Метод дозволять побачити елементи внутрішньої структури прозорого об'єкта. Фазово-контрастний пристрій дає можливість перетворювати фазові зміни світлових хвиль, що проходять через об'єкт, на амплітудні. Через війну прозорі об'єкти стають видимими.

*Цитохімічні дослідження.* Цитохімічні методи є досить прості, відтворювані методики, що не вимагають складної апаратури. Цитохімічні дослідження дозволяють вивчити ферментативну активність, вміст різних речовин у клітинах крові, кісткового мозку, лімфатичних вузлів та інших тканин, дозволяють виявляти спрямованість диференціювання кровотворних клітин. Цитохімічні реакції виконують на мазках, на предметних стеклах, застосовуючи відповідну фіксацію та дофарбування клітин. Оцінка результатів здебільшого обмежується визначення реакції – слабка, помірна, інтенсивна.

Основою ідентифікації клітин є особливості метаболізму, специфічні для кожного типу клітин. Наприклад, мієлопероксидаза, що є лізосомальним ферментом, локалізується переважно в специфічних азурофільних гранулах у

цитоплазмі гранулоцитів і є маркером клітин мієлоїдного ряду. Ліпіди виявляються практично у всіх лейкоцитах, крім лімфоцитів. Однак основна маса ліпідів пов'язана із клітинами гранулоцитарного ряду. Визначення неспецифічної естерази використовується для ідентифікації моноцитарних лейкозних попередників. Визначення активності лужної фосфатази застосовують для диференціювання хронічного мієлолейкозу від інших мієлопроліферативних захворювань та реактивних станів. Забарвлення на кислу фосфатазу використовується виділення волосато-клеточного лейкозу із групи лимфопроліферативних захворювань.

**Імуноцитохімічні дослідження.** Імуноцитохімічними називають методи мікроскопічного виявлення та ідентифікації молекулярних компонентів клітин, засновані на реакції антиген-антитіло. Імуноцитохімічне дослідження – це комбінація цитологічного та імуноферментного методів. При постановці імуноцитохімічних методів потрібно, перш за все, так фіксувати досліджуваний клітинний матеріал, щоб у клітинах зберігалася нативність антигенів, що виявляються. Пероксидаза хрому в присутності невеликої кількості перекису водню каталізує окиснення 3,3'-діамінобензідину з утворенням золотистого-коричневого нерозчинного продукту. Якщо пероксидазу безпосередньо або опосередковано приєднати до антитіл, ця реакція може відбуватися тільки там, де мічені ферментом антитіла зв'язувалися з антигеном. При мікроскопії забарвлених препаратів на тлі звичайної цитологічної картини, наприклад кісткового мозку, можна ідентифікувати коричневий продукт ферментативної реакції, що утворився в місцях зв'язування використаних антитіл з антигенами. Імуноферментне маркування можна здійснювати за допомогою комплексу лужна фосфатаза-антитіла до лужної фосфатази. Кінцевий продукт ферментативної реакції має добре помітний гарний червоний колір.

**Іоноселективний аналіз.** Іоноселективний аналіз – один із найбільш широко використовуваних методів клінічної біохімії. Він заснований на використанні іоноселективних електродів, які є електрохімічними системами, що формують потенціал у розчині електроліту, що залежить від концентрації

іонів. За допомогою іоноселективних електродів визначається активність іонізованих молекул. Іони, пов'язані з білками, іншими аніонами і які перебувають у комплексі, не реєструються іоноселективними електродами, тобто. загальна концентрація мікроелемента не реєструється. Це важливо, оскільки біологічно активними є іонізовані молекули. У клінічній біохімії широко визначаються катіонами є  $H^+$  (рН),  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Li^+$  і аніон  $Cl^-$ .

Основним елементом іоноселективного електрода є мембрана, проникна лише певного іона. Склад мембрани підбирається з виробництва. У скляних електродах формується кристалічна решітка, комірки якої чутливі до іону, що тестується. У мембранних електродах до складу полімеру вводиться індуктор провідності відповідного іона, який формує канали специфічної проникності. Зокрема мембрану визначення активності  $Do^+$  часто вводиться валиномицин,  $Na^+$  – ністатин. До переваг іоноселективних електродів відносяться: можливість прямого вимірювання активності при контакті електрода з біологічною рідиною, портативність та мінімальний обсяг біорідкості (мікролітри), швидка відповідь, що дозволяє використовувати метод при невідкладних станах.

Аналізатори іоноселективні вимірюють активність іонів у сироватці, плазмі, цільній крові, діалізатах, сечі. Мінімальний об'єм проби 100 мкл. Як правило, діапазон вимірюваних концентрацій у сироватці, плазмі, цілісній крові:  $K^+$  0,2-40,0 ммоль/л;  $Na^+$  . 20,0-200,0 ммоль/л;  $Ca^{2+}$  0,10-6,00 ммоль/л; рН 6,0-8,0 од. рН;  $Cl^-$  25,0-200,0 ммоль/л. Роздільна здатність:  $K^+$  0,01 ммоль/л;  $Na^+$  0,1 ммоль/л;  $Ca^{2+}$  0,01 ммоль/л; рН 0,001 од. рН;  $Cl^-$  0,1 ммоль/л. Діапазон вимірювання та чутливість цілком достатні для вимірювання активності іонів у крові в нормі та при патології.

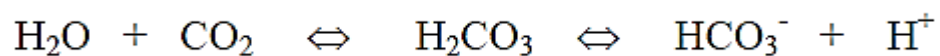
**Аналіз газів крові та гемоксиметрія** . Газообмін у людському організмі виконує дві основні функції:

1. Виведення з організму діоксиду вуглецю, що утворюється внаслідок катаболізму.
2. Забезпечення тканин та органів адекватною кількістю кисню, який є необхідним акцептором електронів ланцюга тканинного дихання.

Кисень і CO<sub>2</sub> транспортуються між альвеолами і тканинами в протилежних напрямках, і відповідні парціальні тиску цих газів у крові не завжди змінюються пропорційно. Цей факт пояснюється так: по-перше, діоксид вуглецю має більшу здатність до дифузії, ніж кисень. Це призводить до того, що, наприклад, при інтерстиціальному набряку легень розвивається порушення дифузії кисню в кров, а отже гіпоксемія в той час як рівень pCO<sub>2</sub> зберігається в нормі. По-друге, кисень переноситься від легень до тканин головним чином у зв'язку з гемоглобіном і дуже невелика кількість O<sub>2</sub> знаходиться у вигляді фізично розчиненого в крові. В артеріальній крові гемоглобін практично повністю насичений киснем і гіпервентиляція, таким чином, може призводити до вираженої гіпокапнії, незначно збільшуючи значення pO<sub>2</sub>. Транспорт CO<sub>2</sub> забезпечується за рахунок розчинення в плазмі і формування бікарбонатної буферної системи і практично не пов'язаний з гемоглобіном.

Концентрація вуглекислого газу в крові залежить від рівня вентиляції легень, ніж вміст кисню.

**Транспорт діоксиду вуглецю.** Транспорт кров'ю, що дифузує з тканин діоксиду вуглецю, здійснюється у двох фазах: у плазмі крові (позаклітинна фаза) та в еритроцитах (клітинна фаза). Як у плазмі, так і в еритроцитах CO<sub>2</sub> транспортується в основному у 2 транспортних формах: фізично розчинений та у формі вугільної кислоти та гідрокарбонат-аніону



Підсумовувати процеси, що відбуваються в еритроцитах, можна наступним чином: CO<sub>2</sub>, що утворюється в тканинах, надходить в еритроцити, де з нього синтезується вугільна кислота, яка дисоціює з утворенням гідрокарбонат-іона та іона водню. Іони водню зв'язуються із вільним гемоглобіном. Гідрокарбонат дифундує з еритроцитів у плазму в обмін на аніони хлору. У легенях йде зворотна реакція. Відновлений гемоглобін окислюється з утворенням оксигемоглобіну та іонів водню, останні зв'язуючись з гідрокарбонатом

утворюють вугільну кислоту.  $\text{H}_2\text{CO}_3$  дисоціює з утворенням діоксиду вуглецю і води.  $\text{CO}_2$  дифундує в альвеоли і виводиться в навколишнє середовище.

**Визначення  $\text{CO}_2$ .** При аналізі газів крові з діагностичною метою вимірюється парціальний тиск газоподібного  $\text{CO}_2$  розчиненого в крові -  $p\text{CO}_2$ . Для цього використовується  $p\text{CO}_2$ -електрод, який складається зі скляного електрода для вимірювання рН, відокремленого від досліджуваного розчину мембраною, що проникається селективно для діоксиду вуглецю. Простір між скляною мембраною та проникною для  $\text{CO}_2$  мембраною заповнено розчином хлориду та гідрокарбонату натрію. Діоксид вуглецю, фізично розчинений у пробі, дифундує в електролітний розчин  $\text{NaCl}$  і  $\text{NaHCO}_3$  де відбувається утворення вугільної кислоти і дисоціація її з утворенням протона. В результаті зміна рН електролітного розчину знаходиться в лінійній залежності від дифузного  $\text{CO}_2$  і реєструється скляним електродом. Лінійність вимірювань для  $p\text{CO}_2$ -електродів знаходиться в діапазоні від 8 до 200 мм. Нг парціального тиску діоксиду вуглецю.

Транспорт кисню. Як і діоксид вуглецю кисень у крові може перебувати у двох фазах:

1. Розчинений у плазмі крові (позаклітинна фаза);
2. Оксигемоглобін еритроцитів (клітинна фаза).

У 100 мл крові здорової людини, яка дихає повітрям, міститься 0,3 мл розчиненого кисню, що незрівнянно мало з потребами організму. Кількість споживаного тканинами кисню у стані спокою становить близько 250 мл/хв.

Гемоглобін - це одна з найбільш значущих біохімічних сполук. Він дозволяє об'єму цільної крові зв'язувати у 65 разів більше кисню, ніж такий самий об'єм плазми. Більше того, зв'язок кисню з гемоглобіном – оборотний. Графік залежності ступеня насичення гемоглобіну киснем ( $\text{HbO}_2$ ) від парціального тиску кисню в крові ( $P_{a\text{O}_2}$ , Нг), який називається кривою дисоціації оксигемоглобіну, ілюструє процес утворення та дисоціації оксигемоглобіну (мал. 11). Крива, що характеризує цю залежність, має S-подібний вигляд. Ступінь насичення гемоглобіну ( $s\text{O}_2$ ) киснем визначається згідно з формулою:

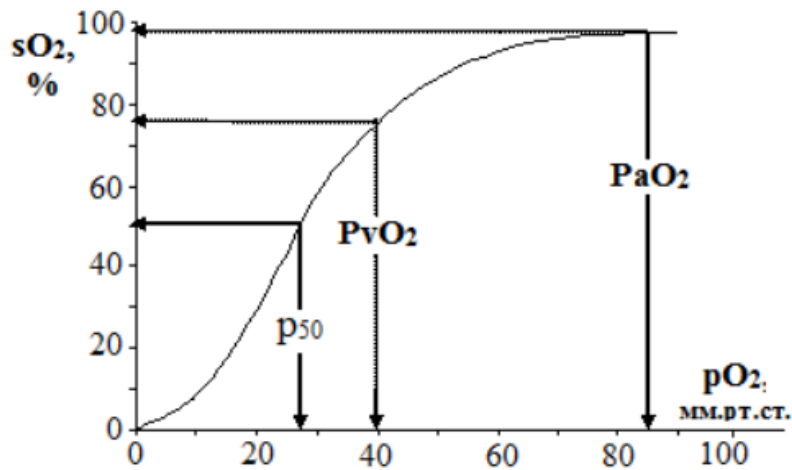
$$sO_2, \% = \frac{\text{кількість } O_2, \text{ зв'язаного з Hb}}{\text{киснева ємність Hb}} \times 100$$

Киснева ємність гемоглобіну – максимальна кількість кисню, здатного з'єднатися з Hb. 1 грам гемоглобіну теоретично може приєднати 1,39 мл  $O_2$ . При  $P_{aO_2} = 100$  мм Hg гемоглобін насичений киснем на 97,5%. Подальше збільшення  $P_{aO_2}$  призводить до зростання  $s_{O_2}$  лише на 0,3%. Нижній сегмент кривої характеризує процес дисоціації оксигемоглобіну. При 40 мм Hg гемоглобін насичений киснем на 75%, а при  $P_{V_2} 10$  мм Hg – лише на 10%.

**Вимірювання  $P_{O_2}$ .** Ключовим показником в оцінці метаболізму кисню є парціальна його напруга –  $p_{O_2}$ . Цей показник простежується щодо кисню у повітрі, плазмі крові, тканинної рідини. Вимірюється  $p_{O_2}$  амперометрично за допомогою електрода Кларка. Він складається з тонкого платиного дроту (катод, вплавлений у скляний циліндр) та Ag/AgCl дроту (анод, референтний), які занурені у розчин фосфатного буфера та KCl.  $P_{O_2}$  дифундує через напівпроникну мембрану розчин електроліту, де він відновлюється на катоді. Сила електричного струму, що утворюється при цьому, пропорційна величині  $p_{O_2}$  в досліджуваному зразку.

Параметр  $P_{50}$  характеризує спорідненість гемоглобіну до кисню. Ця величина визначає парціальний тиск кисню у крові, у якому відбувається 50% насичення гемоглобіну киснем. Людина при 37°C, pH крові = 7,4,  $p_{CO_2} = 40$  мм Hg і  $Hb = 150$  г/л,  $P_{50}$  становить середньому 26,8 мм Hg (3,6 кПа). Якщо спорідненість гемоглобіну до кисню збільшується, крива дисоціації зміщується вліво і  $P_{50}$  зменшується. При цьому гемоглобін добре зв'язує кисень у легенях, але погано віддає його тканинам. У разі зменшення спорідненості гемоглобіну крива дисоціації зміщується праворуч,  $P_{50}$  збільшується, при цьому знижується здатність гемоглобіну зв'язувати кисень у легенях, але полегшується звільнення кисню у тканинах.





Мал. 11. Крива дисоціації оксигемоглобіну в нормі

**Молекулярно-генетичні методи аналізу** Молекулярна діагностика у лабораторних дослідженнях займається виявленням патологій, вивченням їх причин та механізмів розвитку на молекулярному рівні. Перевага підходу полягає в тому, що він дає можливість виявити схильність до того чи іншого захворювання задовго до його клінічних проявів, вчасно вжити профілактичних заходів, запобігши його розвитку або полегшивши його перебіг, та з урахуванням індивідуальних особливостей застосовувати терапію. Серед молекулярно-генетичних технологій найбільш широко застосовуються в діагностичній практиці методи виявлення відомих ендогенних і екзогенних ДНК послідовностей, які можна розділити на два класи: гібридизаційний аналіз нуклеїнових кислот і ампліфікаційні методи.

**Гібридизаційний аналіз.** В основі методу лежить здатність нуклеїнових кислот до гібридизації – утворення дволанцюгових структур за рахунок взаємодії комплементарних послідовностей нуклеотидів. Розрізняють два типи гібридизаційного аналізу:

- методи гібридизаційного аналізу, що проводяться у розчині (гомологічні);
- методи гібридизаційного аналізу, що проводяться на твердому носії (гетерогенні).

Останні набули більшого поширення у зв'язку з тим, що мають більшу аналітичну чутливість і специфічність, є більш технологічними, їх простіше стандартизувати та автоматизувати.

Принцип методу ґрунтується на гібридизації зонда на твердій поверхні. Як тверду поверхню найчастіше використовують полімерну нейлонову мембрану. Аналіз складається з наступних стадій:

- пробопідготовка (виділення ДНК із зразка);
- фіксація ДНК зразка на мембрані;
- гібридизація з ДНК-зондом, міченим флюорофором або ферментом;
- детекція результату

У лабораторній практиці застосовується сендвіч-технологія. При цьому підході застосовуються 2 зонди, гомологічні різним ділянкам нуклеотидного ланцюга ДНК або РНК-мішені. Один зонд фіксують на мембрані для того, щоб зв'язати мету, що шукається, присутня в досліджуваному зразку. Після здійснення гібридизації мембрану відмивають від досліджуваного матеріалу і додають розчин, що містить другий зонд, який являє собою кон'югат олигонуклеотида і будь-якої мітки. Процес гібридизації проводять повторно, при цьому зонд з міткою взаємодіє з ділянкою ДНК, що шукається (РНК). Детекція проводиться залежно від природи мітки ферментно-гібридизаційним, радіографічним, авторадіографічним, флюоресцентним або хемілюмінесцентним методами. Перевага цього підходу полягає в тому, що практично зведені до мінімуму підготовка клінічного матеріалу та очищення нуклеїнових кислот. У сучасних наборах реагентів, які пропонуються для діагностичних досліджень, застосовується хемілюмінесценція, яка забезпечує чутливу детекцію результатів гібридизації. Технологія автоматизована, час виконання аналізу становить 2,5-3 год.

У міру мініатюризації відповідних носіїв-підкладок для гібридизації в практику увійшли мікрочіпи (microarrays) із сотнями та тисячами ДНК-зондів для виявлення практично будь-яких відомих генів, їх варіантів та мутацій. Часто для гібридизації застосовують вихідні нуклеїнові кислоти, а продукти

ампліфікації цільових генів. Облік результатів гібридизації на біочипах здійснюється у вигляді оптичних пристроїв, запропонованих кампанією-розробником.

**Метод полімеразної ланцюгової реакції.** Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – молекулярно-біологічний метод дослідження, який набув широкого поширення в сучасних лабораторіях і використовується для діагностики інфекційних, спадкових та онкологічних захворювань, а також для дослідження складу умовнопатогенної флори. Цінність методу полягає в багаторазовому копіюванні (ампліфікації) певних, специфічних тільки для даної мішені ділянок ДНК у процесі температурних циклів, що повторюються. На кожному циклі ампліфікації синтезовані раніше фрагменти знову копіюються ДНК-полімеразою. Завдяки цьому відбувається збільшення концентрації специфічних для цієї мішені фрагментів ДНК у мільйони разів, що значно спрощує подальший аналіз.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції необхідна наявність реакційної суміші ряду основних компонентів.

*Праймери* – штучно синтезовані олігонуклеотиди, що мають, як правило, розмір від 15 до 30 нуклеотидів, ідентичні відповідним ділянкам ДНК-мішені. Вони відіграють ключову роль освіти продуктів реакції ампліфікації. Правильно підібрані праймери забезпечують специфічність та чутливість тест-системи.

*Таq-полімераза* - термостабільний фермент (максимальна активність ферменту проявляється при темп. 70-74°C (хоча фермент може працювати і при більш низьких температурах). Джерело походження цього ферменту - мікроорганізм *Thermus aquaticus*, час напівжиття при 94°C становить близько 45 хв. Таq -полімераза забезпечує добудовування 3'-кінця другого ланцюга ДНК згідно з принципом комплементарності. Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ) дезоксиаденозинтрифосфату (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфату (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфату (дЦТФ) і дезокситимідинтрифосфату (дТТФ) – «це будівельний матеріал».

*Буфер* – суміш катіонів та аніонів у певній концентрації, що забезпечує оптимальні умови для реакції, а також стабільне значення рН.

*Аналізований зразок* – це підготовлений до внесення до реакційної суміші препарат, який може містити шукану ДНК, наприклад ДНК мікроорганізмів, що служить мішенню для подальшого багаторазового копіювання. За відсутності ДНК-мішені специфічний продукт ампліфікації не утворюється.

В ідеальних умовах проведення реакції за 35 циклів ПЛР синтезується кілька мільярдів копій амплікону певної довжини. Цієї кількості достатньо для достовірної візуальної детекції цього фрагмента, наприклад, за допомогою флюориметрії або методом електрофорезу в агарозному гелі.

**Клоттингові методи дослідження гемостазу.** Клоттингові або коагуляційні методи засновані на визначенні проміжку часу від додавання стартового реактиву, що запускає каскад згортання плазми, до утворення згустку (випадання фібрину). При постановці коагуляційних тестів необхідно перемішати плазму з реактивом до гомогенної суспензії та підтримувати стабільну температуру реакції. Коагуляційні тести нині найбільш поширений методичний підхід для оцінки плазмового гемостазу у клініко-діагностичних лабораторіях. Коагуляційні методи є скринінговими, проте, на їх основі сконструйовано ряд методів для оцінки активності факторів плазми. Розроблені та активно застосовуються амідолітичні тести з хромогенними субстратами, що часто дублюють клоттингові тести. Тим не менш, клоттингові є пріоритетними та виконують роль референтних при аналізі плазмового гемостазу.

Клоттингові методи практично повсюдно автоматизовані та виконуються на коагулометрах. Це значно розширило можливості оцінки гемостазу у клініко-діагностичних лабораторіях. Водночас це потребує якісного покращення преаналітичного етапу, жорстких вимог до пробопідготовки.

**Коагулометри.** В основі реєстрації моменту випадання згустку у коагулометрах використовуються кілька принципів: механічний, турбідиметричний, оптико-механічний.

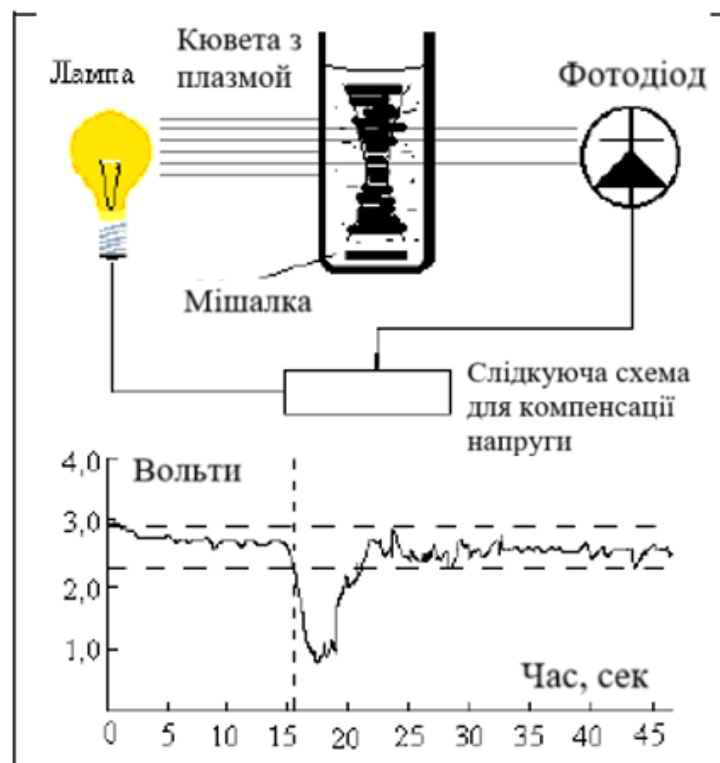
**Механічні коагулометри.** Принцип роботи механічних коагулометрів представлений на мал. 12. В одному з варіантів кювету з плазмою обертається у похилому положенні. Металева кулька в кюветі почне обертатися при згортанні плазми. Момент захоплення кульки згустком, що випав, і початок його обертання разом з кюветою фіксується магнітним датчиком. При інших варіантах реєструється припинення обертання всередині кювети магнітної мішалки, захоплення згустку гачком, що опускається в кювету, або інші схеми, засновані на переході рідкої плазми в згусток. Механічні коагулометри характеризуються високою надійністю та простотою в обслуговуванні. Важливо те, що механічні коагулометри можуть працювати на цілісній крові. Основні проблеми виникають у ситуаціях, коли формується нещільний потік, наприклад при використанні гепарину. У цих випадках фібрин, що випадає, часто не може відразу захопити за собою механічний пристрій, результати виходять погано відтворюваними. Іншою проблемою є формування на кульці, мішалці або інших пристроях, занурених у кювету, білкових конгломератів, які заважають реєстрації.



Мал. 12. Принцип роботи механічного коагулометра. Кювета з плазмою розташована під нахилом і обертається, кулька стоїть на місці, не обертається. У момент згортання кулька захоплюється згустком, як тільки кулька йде від датчика змінюється магнітне поле, прилад реєструє момент згортання плазми

**Оптико-механічні коагулометри.** Коагулометри цього класу характеризуються здатністю реєструвати пласти фібрину, що випадають, навіть без формування щільного згустку, що буває при прийомі пацієнтами антикоагулянтів, а також у випадках коагулопатій. Принцип оптико-механічного

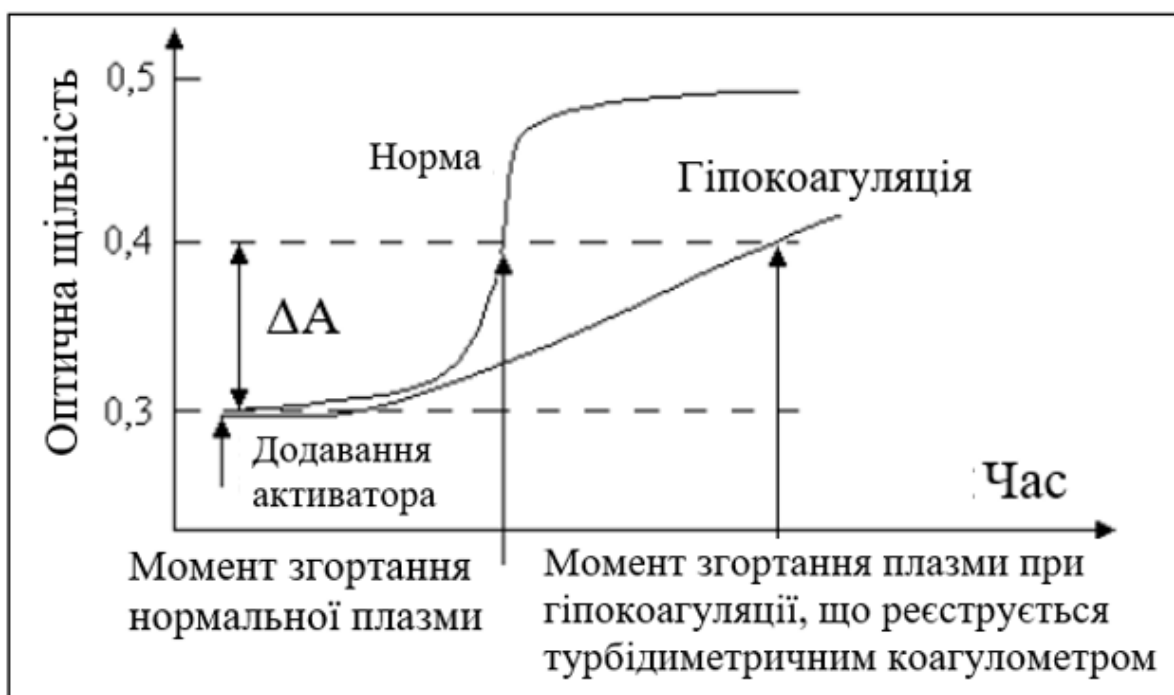
коагулометра представлений на мал. 13. За рахунок використання слідкуючої схеми реєструється зміна напруги, що подається на лампу, щоб забезпечувався заданий світловий потік, що проходить через кювету зі зразком. У цьому випадку різко зменшується вплив вихідної густини плазми, її іктеричності та ліпемічності, в принципі, можливо досліджувати згортання плазми з тромбоцитами.



Мал. 13. Принцип реєстрації фібрину, що випадає, оптико-механічним коагулометром.

Нитки фібрину, що випали в кюветі, змінюють світловий потік, що падає на фотодіод. Фотодіод пов'язаний через схему компенсації, що слідкує, з напругою на лампі. В результаті на лампу подається така напруга, яка змінює яскравість світла лампи, щоб світловий потік, що потрапляє на світлодіод, підтримувався в заданому діапазоні. По зміні напруги на лампі реєструється початок випадання фібринового згустку

**Турбідиметричні коагулометри.** Турбідиметричні коагулометри реєструють момент зсідання крові за приростом оптичної щільності (мал. 14). При зсіданні плазми відбувається різка зміна світлопропускання або розсіювання. У коагулометрі програмується, при якому прирості оптичної густини по відношенню до вихідного рівня ( $\Delta A$ ) реєструється момент згортання. Час від внесення в оптичну кювету індуктора згортання до моменту досягнення заданого  $A$  визначається як час згортання плазми в досліджуваному тесті. Турбідиметричний принцип використовується щодо показників згортання плазми на багатофункціональних фотометрах і біохімічних аналізаторах.



Мал. 14. Принцип реєстрації моменту утворення згустку турбідиметричним коагулометром. При згортанні плазми відбувається різке збільшення оптичної щільності в фотометричній комірці. Коагулометр визначає час від внесення активатора згортання до моменту зміни оптичної щільності на (наприклад, на 0,1 од. оптичної щільності)

**Нефелометричні коагулометри.** Нефелометричні коагулометри визначають момент утворення згустку зміни розсіювання світла. Розробки в цій галузі технологій використовують принцип визначення згустку з бокового розсіювання світла (мал. 15). Метод розсіювання забезпечує високу якість аналізів – високу

специфічність та чутливість детекції згустку навіть для складної ліпемічної чи іктеричної плазми.



Мал. 15. Нефелометричний принцип вимірювання світлорозсіювання. Метод дозволяє підвищити точність вимірювань та відтворюваність до 2-3%, а також знизити вплив на результат самого зразка

Сучасні коагулометри поєднують в одному приладі кілька методів виміру, тому можуть використовуватися для комплексної оцінки гемостазу.

Автоматизований підрахунок клітин крові. Автоматичні лічильники крові оцінюють розміри, структурні, цитохімічні та інші властивості клітин. Вони аналізують близько 10000 клітин в одному зразку та мають кілька різних каналів підрахунку клітинних популяцій та концентрації гемоглобіну. На підставі кількості визначених параметрів та ступеня складності їх умовно поділяють на 3 основні класи:

*I клас* – автоматичні гематологічні аналізатори, що визначають до 20 параметрів, включаючи розрахункові показники червоної крові та тромбоцитів, гістограми розподілу лейкоцитів, еритроцитів та тромбоцитів за обсягом, а так само часткове диференціювання лейкоцитів на три популяції – лімфоцити.

*II клас* – високотехнологічні гематологічні аналізатори, що дозволяють проводити розгорнутий аналіз крові, у тому числі повне диференціювання лейкоцитів за 5-ти параметрами-нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, моноцити та лімфоцити (5Dif), гістограми розподілу лейкоцитів, ері.



*III клас* – складні аналітичні системи, що виконують не тільки розгорнутий аналіз крові з диференціюванням лейкоцитів, а й підрахунок та аналіз ретикулоцитів, деяких субпопуляцій лімфоцитів; при необхідності комплектуються блоком для автоматичного приготування та фарбування мазків із заданих зразків крові.

У основі роботи аналізаторів 1-го класу лежить кондуктометричний метод. Аналізатори 2 та 3-го класів використовують у своїй роботі комбінації різних методів.

***Кондуктометричні гематологічні аналізатори.*** Технологія автоматичного підрахунку клітин заснована на підрахунку числа та визначенні характеру імпульсів, що виникають при проходженні клітин через отвір малого діаметра (апертуру), по обидва боки якого розташовані два ізольовані один від одного електроди. Якщо через вузький канал, заповнений електропровідним розчином, проходить клітина крові, то опір електричному струму в каналі зростає. Кожна подія – проходження клітин через канал, супроводжується появою електричного імпульсу. Концентрацію клітин визначають за кількістю електричних імпульсів.

Поділ еритроцитів та тромбоцитів проводиться за вимірюванням амплітуди електричного сигналу: тромбоцити при проходженні вимірювального каналу генерують електричні імпульси низької амплітуди, еритроцити та лейкоцити – імпульси високої амплітуди. Після лізису еритроцитів у суспензії залишаються лейкоцити. З першого рахунку імпульсів високої амплітуди віднімають імпульси високої амплітуди другого рахунку (лейкоцити). Різниця імпульсів високої амплітуди до та після лізису відповідає кількості еритроцитів.

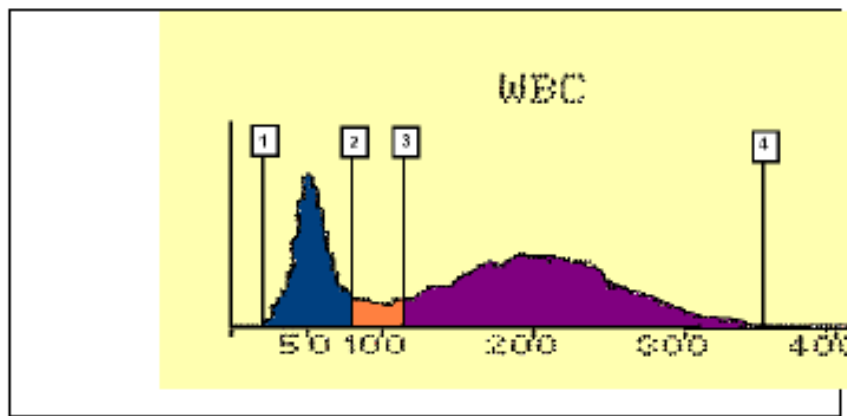
Розподіл незмінених лейкоцитів кондуктометричним методом на основні субпопуляції неможливий через близькість їх обсягів, проте підбирають таку композицію розчинника і гемолітика, що різні форми лейкоцитів зазнають змін розмірів різною мірою і, завдяки цьому, можуть розділятися. Зміна об'єму клітини залежить від багатьох факторів, що включають величину та форму ядра, об'єм цитоплазми, наявність внутрішньоклітинних включень, тому розмір

трансформованих клітин не відповідає розмірам клітин при візуальному перегляді їх у мазку крові. Після трансформації лейкоцити розподіляються на гістограмі в такий спосіб (мал. 16):

- Область малих обсягів (35-90 фл) формується лімфоцитами, які під дією гемолітика значно зменшуються обсягом.

- Навпаки, гранулоцити (нейтрофіли, базофіли та еозинофіли) піддаються невеликому набуханню і розташовані в області великих обсягів (120-400 фл).

- Між двома піками є зона про «середніх лейкоцитів» (90-120 фл), яка найкраще корелює з моноцитами. Однак у область середніх клітин можуть частково потрапляти базофіли, еозинофіли, різні патологічні форми.



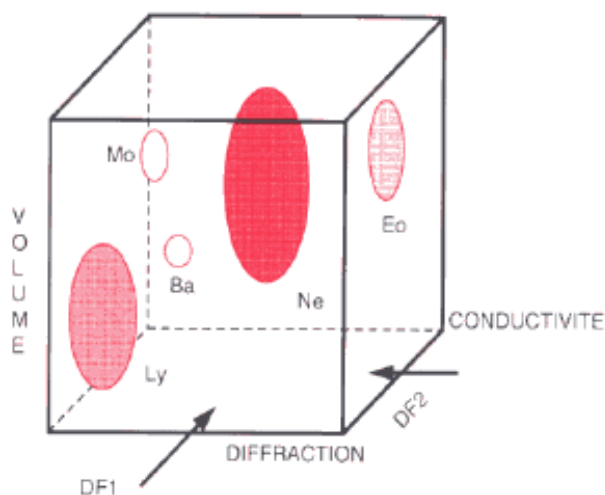
Мал. 16. Схема гістограми розподілу лейкоцитів за обсягом при кондуктометричному диференціюванні. Між 1 та 2 дискримінаторами розташовується зона лімфоцитів, між 2 та 3 – «середніх» клітин, між 3 і 4 – гранулоцитами.

### **Високотехнологічні гематологічні аналізатори.**

Високотехнологічні гематологічні аналізатори здатні здійснювати диференційований рахунок лейкоцитів по 5-ти (5Diff) основним популяціям, використовуючи різні принципи диференціювання клітин: нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, моноцити та лімфоцити, оцінювати наявність незрілих грану. стовбурових гемопоетичних клітин та субпопуляцій лімфоцитів. Численні функції гематологічних аналізаторів стали можливими завдяки розвитку нових технологій. У кожному випадку в цій групі аналізаторів застосовується не менше

трьох різних технологій, комбінований результат яких дає можливість диференціювати лейкоцити.

*Технологія VCS* включає одночасний комп'ютерний аналіз клітин за обсягом, електропровідністю та дисперсією лазерного світла. Отримані за трьома каналами дані за допомогою електроніки комбінуються та аналізуються, в результаті відбувається розподіл клітин по диференційних кластерів і, таким чином, лейкоцити поділяються на п'ять основних популяцій: лімфоцити, моноцити, нейтрофіли, еозинофіли та базофіли (мал. 17). Результатом відображення об'ємного графіка на площині є лейкоцитарна скатерограма, де кожен тип клітин має свою зону розташування.



Мал. 17. VCS-куб, що визначає лейкоцитарну скатерограму. Клітинні кластери розміщуються на кольоровій об'ємній діаграмі, де по осі X – нормована здатність, що розсіює, по осі Y – об'єм клітин, по осі Z – структурна електропровідність

*Технологія MAPSS* – Multi Angle Polarized Scatter Separation – мультипараметрична система лазерного світлорозсіювання – реєстрація інтенсивності розсіювання клітинами поляризованого лазерного променя під різними кутами. Цей метод полягає у комп'ютерному аналізі дисперсії лазерного рахунку клітинами крові. Розсіювання клітиною поляризованого лазерного променя під різними кутами дає відомості про її властивості, як:

- *розмір клітин* – навіщо оцінюється проходження поляризованого лазерного променя під малим кутом розсіювання,

- *структура та ступінь складності клітин* – оцінюється за аналізом розсіювання поляризованих лазерних променів, спрямованих під кутом до  $7^\circ$ ,
- *ядерно-цитоплазматичне співвідношення* - оцінюється за аналізом розсіювання поляризованих лазерних променів, спрямованих під кутом до  $10^\circ$ ,
- *оцінка форми клітинного ядра* – здійснюється завдяки аналізу світлорозсіювання поляризованих лазерних променів під кутом  $90^\circ$ ,
- *для оцінки клітинної зернистості та диференціювання еозинофілів* використовується оцінка світлорозсіювання деполаризованого променя під кутом в  $90^\circ$ .

*Принцип рідинної цитохімії* (вимірювання активності пероксидази в лейкоцитах) у поєднанні з методами кондуктометрії, гідродинамічного фокусування, оптичної абсорбції дозволяє проводити диференціювання лейкоцитів. Використання пероксидазної реакції засноване на різній її активності у лейкоцитах. Так, еозинофіли та нейтрофіли мають інтенсивну пероксидазну активність, моноцити – слабку, у лімфоцитах вона не виявляється.

*Проточна цитохімічна техніка* включає реєстрацію розсіяного та поглиненого світлового променя. У лейкоцитарному каналі після лізису еритроцитів та стабілізації лейкоцитів відбувається цитохімічна реакція, далі лейкоцити диференціюються за двома ознаками: розміром клітин, що визначається методом розсіювання лазерного променя, та пероксидазної активності – по поглинанню клітиною світлового потоку. Диференціювання базофілів з інших гранулоцитів проводиться у базо-каналі. Цитоплазма всіх лейкоцитів крім базофілів піддається лізису після обробки проби специфічним лізатом.

*Проточна цитофлюориметрія* з використанням флуоресцентного барвника поліметину, який зв'язується з ДНК та РНК клітин, дозволяє використовувати його для диференціювання лейкоцитів та для підрахунку ретикулоцитів. Аналіз клітин відбувається у проточній кюветі при перетині лазерного променя. Після контакту лазерного променя з пофарбованою клітиною відбувається

розсіювання останнього під великим та малим кутами та збудження флуоресцентного барвника.

Гематологічні аналізатори з повним диференційованим підрахунком лейкоцитів дозволяють з високою точністю диференціювати лейкоцити, провести скринінг норми та патології, динамічний контроль за лейкоцитарною формулою та різко скоротити ручний підрахунок лейкоцитарної формули.

**Проточна цитофлуориметрія.** В основі проточної цитофлуориметрії лежить проведення фотометричних та флуоресцентних вимірювань окремих клітин, що перетинають одна за одною разом із потоком рідини лазерний промінь монохроматичного світла. Фотометричні канали використовуються для оцінки розмірів клітин та внутрішньоклітинних структур. Частинки, що відрізняються за розмірами, по-різному розсіюють світло, при цьому характер розсіювання залежить від співвідношення довжини хвилі світла та діаметра частинок. Якщо розмір частинок менший за довжину хвилі опромінюючого монохроматичного світла лазера (наприклад, внутрішньоклітинні структури), то істотна кількість світла розсіюється під кутом  $90^\circ$  (бічне світлорозсіювання). У тому випадку, коли довжина хвилі опромінення порівнянна з розмірами частинок, що розсіюються, світлова хвиля як би огинає частинку, взаємодіє з нею і відхиляється від прямолінійного поширення на невеликий кут - малокутове світлорозсіювання. Такий тип розсіювання виникає при взаємодії світла із поверхнею клітин різного розміру. При одночасній реєстрації бічного та прямого світлорозсіювання можна виділити всі клітинні популяції лейкоцитів. Флуоресцентний канал застосовується для вивчення клітинних маркерів, при цьому використовуються моноклональні антитіла (МАТ) до мембранних та внутрішньоклітинних компонентів, мічені різними флюорохромними барвниками. При опроміненні клітин довжиною хвилі, що збуджує флюорохром, відбувається поглинання світла. Потім флюорохром випромінює світло, але вже меншої інтенсивності (більшої довжини хвилі), ніж поглинений. Крім того, флюорохром випромінює світло на всі боки, тому флуоресценцію можна реєструвати під будь-яким кутом по відношенню до опромінюваного світла.

Проточні цитофлюориметри можуть бути обладнані одним, двома чи більше лазерами. У разі використання двох або більше лазерів у дослідження можуть бути включені флюорохроми, які збуджуються на різних довжинах хвиль. Використання кількох флюоресцентних міток дозволяє проводити одночасний дво-, триколірний і більше аналіз, оскільки кожен флюорохром при проходженні через промінь лазера випромінює світло різної довжини хвилі. Найчастіше в якості мітки, що фарбує, застосовується флюоресцеїнізотіоціонат (FITC), який спускає світло, що уловлюється в зеленій області спектру, фікоеритрин (PE) - червоне світіння. При виборі поєднань флюорохромів для одночасного визначення кількох клітинних маркерів слід враховувати здатність оптичної системи приладу розділяти і одночасно реєструвати сигнали від флюорохромів, що використовуються. Використання багатобарвного проточноцитометричного дослідження дозволяє одночасно отримати інформацію про декілька антигенів на поверхні клітин. Проточна цитофлюориметрія - технологія, що швидко розвивається в клінічній лабораторній діагностиці. Основними напрямками проточної цитометрії вважаються кількісна та функціональна характеристика клітин:

- поверхневі антигени;
- внутрішньоклітинні цитоплазматичні молекули – цитокіни, бактерицидні білки, сигнальні молекули, білки цитоскелету;
- внутрішньоклітинні ядерні молекули (транскрипційні фактори, ядерні білки, ДНК та її фрагменти, РНК, хромосоми, мембранний потенціал мітохондрій, концентрація іонів  $Ca^{2+}$ , активність ферментів;

- оцінка абсолютної кількості  $CD4^+$  Т-лімфоцитів для оцінки активності ВІЛ.

Проточна цитофлюориметрія відіграє ключову роль онкогематології. Вона використовується з метою діагностики та моніторингу пухлинної популяції при гострих лейкозах та лімфопроліферативних захворюваннях (ЛПЗ), прогнозу, підрахунку абсолютної кількості стовбурових гемопоетичних клітин, діагностики пароксизмальної нічної гемоглобінурії.

Розробка гібридної технології одержання моноклональних антитіл (МАТ) надала можливість вивчити лінійно-специфічні, диференціювальні, активаційні антигени клітин. МАТ зі схожою специфічністю були об'єднані у групи (кластери). Початкове значення поняття «кластер диференціювання» (CD – cluster of differentiation) передбачав набір МАТ, що розпізнають одну й ту саму антигенну структуру на поверхні клітин. Згодом термін «кластер диференціювання» став означати саму структуру на клітинній мембрані, що відбиває фенотип клітини. Відомо понад 300 кластерів диференціювання клітин людини та їх кількість постійно поповнюється.

Проточна цитофлюориметрія дозволяє досліджувати антигени, що мають прогностичне значення. Широке використання у клінічній практиці моноклональних антитіл значно покращило результати лікування хворих на лімфоми. Для їх успішного застосування необхідно до початку терапії дослідити ступінь експресії антигенів на відповідних клітинах-мішенях. Використовуючи метод проточної цитофлюориметрії, під час лікування можна проводити моніторинг залишкової популяції пухлинних клітин. Широке використання проточної цитофлюориметрії в онкогематології призвело до якісно нової діагностики лейкозів та лімфом, а також розробки нових підходів в оцінці ефективності лікування та моніторингу мінімальної залишкової хвороби, що визначає подальшу тактику ведення хворих.

**Електрофорез.** Електрофорез – рух заряджених частинок у розчині під впливом електричного поля. Електрофоретичний метод у клінічній лабораторній діагностиці – це спосіб просторового поділу молекул, що мають різний заряд та розміри, шляхом поміщення їх в електричне поле. Електрофореграма білків біологічних рідин людини (сироватка крові, сеча, спинномозкова рідина) дозволяє отримати значну діагностичну інформацію. У здорової людини відносний вміст білкових фракцій при визначенні їх у сироватці крові методом електрофорезу на папері, наступне: альбуміни – 55-65%,  $\alpha$ 1-глобуліни 3-6%,  $\alpha$ 2-глобуліни 7-10%,  $\beta$ -глобуліни – 7-12 %,  $\gamma$ -глобуліни – 13-19%.

При багатьох захворюваннях спостерігається зміна співвідношення фракцій, тоді як загальна кількість білка, зазвичай, мало змінюється. Виявлення цих змін за допомогою методу електрофорезу широко використовується у діагностичних цілях.

Основними типами електрофорезу є: зональний електрофорез, ізотахофорез, ізоелектричне фокусування, імуноелектрофорез.

*Зональний електрофорез* ведеться при постійному (не змінюється) значенні рН буферного розчину, що заповнює цей носій (папір, гель, ін.). Досліджуваний зразок наноситься прямою або тонким шаром на носій, яким і переміщається в електричному полі. Ускладненим варіантом зонального електрофорезу є диск-електрофорез (багатофазний зональний електрофорез), при якому рН та інші характеристики, постійні всередині однієї «фази», при переході до іншої фази стрибкоподібно змінюються.

*При ізоелектричному фокуванні* серед електрофорезу створюється плавний градієнт рН. Білок зупиняється в зоні, де значення рН дорівнює його ізоелектричній точці (рІ). Для створення градієнта рН зазвичай використовують розчин поліаміно-полікарбонівих кислот, яким насичують носій. У відсутності електричного поля ця суміш має рН=6,5. При накладенні електричного поля вказані кислоти забезпечують лінійний градієнт рН від 3 до 10.

*При ізотахофорезі заряджені іони* спочатку поділяються відповідно до величин їх заряду і рухливості, а потім переміщуються в електричному полі з однаковими і постійними швидкостями.

*Імуноелектрофорез* поєднує в собі електрофоретичний поділ білків з імунопреципітацією, що ґрунтується на реакції «антиген – антитіло». Цей тип електрофорезу перевершує інші за чутливістю та роздільною здатністю.

В електрофорезі важливий тип носія рідкої фази. Переваги та обмеження кількох носіїв, що використовуються у клінічній біохімії представлені в табл. 2.3.

За допомогою електрофорезу можливий поділ не лише білкових фракцій, але також ліпопротеїдів, ізоферментів лактатдегідрогенази, лужної фосфатази,



виділень фракції глікованого гемоглобіну. Це досягається у нових розробках, зокрема при використанні капілярного електрофорезу.

*Капілярний електрофорез* заснований на розподілі компонентів складної суміші в кварцовому капілярі під дією прикладеного електричного поля. Мікрооб'єм аналізованого розчину (близько 2 нл) вводять у капіляр, попередньо заповнений відповідним буфером – електролітом. Після подачі до кінців капіляра високої напруги (до 30 кВ) компоненти суміші починають рухатися по капіляру з різною швидкістю, яка залежить від заряду і маси і в різний час досягають зони детектування.

**Хроматографічні методи.** Хроматографія – фізико-хімічний метод поділу та аналізу сумішей, заснований на розподілі їх компонентів між двома фазами – нерухомою та рухомою (елюент), що протікає через нерухому. Хроматографічний аналіз є критерієм однорідності речовини: якщо хроматографічним способом аналізована речовина не розділилася, його вважають однорідним (без домішок). Принциповою відмінністю хроматографічних методів від інших фізико-хімічних методів аналізу є можливість поділу близьких за властивостями речовин. Після поділу компоненти аналізованої суміші можна ідентифікувати та кількісно визначати (масу, концентрацію) будь-якими хімічними, фізичними та фізико-хімічними методами. Залежно від природи взаємодії, що зумовлює розподіл компонентів між елюентом та нерухомою фазою, розрізняють такі види хроматографії – адсорбційну, розподільчу, іонообмінну, ексклюзійну (молекулярно-ситову). Адсорбційна хроматографія заснована на відмінності сорбируемості речовин, що розділяються адсорбентом (тверде тіло з розвиненою поверхнею); розподільна хроматографія - на різній розчинності компонентів суміші в нерухомій фазі та елюенті; іонообмінна хроматографія - на відмінності констант іонообмінної рівноваги між нерухомою фазою (іонітом) і компонентами суміші, що розділяється; молекулярно-ситова) хроматографія – на різній проникності молекул у нерухому фазу (високопористий неіоногенний гель). Відповідно до агрегатного стану елюентів розрізняють:

□ газому

рідинну хроматографію ВЕРХ (HPLC). Газова хроматографія застосовується для газів поділу, визначення домішок шкідливих речовин у повітрі, воді, визначення складу продуктів основного органічного синтезу, лікарських препаратів. Рідина хроматографія використовується для аналізу, поділу та очищення синтетичних полімерів, лікарських препаратів, детергентів, білків, гормонів та ін біологічно важливих сполук. Використання високочутливих детекторів дозволяє працювати з дуже малими кількостями речовин (10<sup>-11</sup>-10<sup>-9</sup> г), що дуже важливо у біологічних дослідженнях.

**Мікрочіпова технологія.** Біологічні мікрочіпи - технологія, яка виконується одночасно на великій кількості мікрозон (мікроарреїв), які нанесені специфічні антигени (білковий аналіз) або праймери нуклеїнових кислот (ДНК\РНК аналіз). Мікрочіпи призначені для виявлення великої кількості можливих варіантів біохімічних, імунохімічних, молекулярно-біологічних реакцій. Висока продуктивність, відносно низька вартість аналізу, поряд з високою чутливістю та специфічністю визначення, роблять цей напрямок у клінічній лабораторній діагностиці найперспективнішим. Завдяки високій чутливості, біочіп-аналізатор здатний виявляти дуже низькі концентрації аналітів. Можна говорити про реєстрацію окремих молекул, якщо їх щільність у мікроареях становить близько 1 молекули на квадратний мікрон.

Конкурентні переваги мікропланшетних імуночипів обумовлені тим, що їх застосування дозволяє кардинально підняти продуктивність лабораторій. Крім того, знижуються витрати на видаткові реагенти, так як вартість мультиплексних тестів у розрахунку на один аналіт, що виявляється, значно нижча. Мікропланшетний формат технології дозволяє легко адаптувати її для будь-якої клінічної лабораторії, оскільки не потрібне інше додаткове обладнання, крім біочіп-аналізатора. Підготовка проб здійснюється як і в імуноферментному аналізі з використанням звичайного лабораторного обладнання для роботи з мікропланшетами (шейкери, промивачі, диспенсери). Переваги технології імуночипів очевидні, коли йдеться про отримання комплексної картини захворювання, що формується за допомогою лабораторних тестів, а також при

аналізі малих кількостей матеріалу, що тестується, наприклад при скринінгу новонароджених з використанням мікроразків крові, висушеної на фільтрувальному папері. Мікрочіпові системи розробляються для здійснення біохімічних, ензиматичних, імуноферментних реакцій, реакцій ДНК-гібридизації, полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Особливий інтерес подібні системи представляють для аналізу молекул ДНК методом ПЛР для діагностики таких захворювань як туберкульоз, вірусний гепатит, інфекцій, що передаються статевим шляхом, онкологічних та генних захворювань, а також визначення геному людини та ідентифікація особистості. З відкриттям ДНК-мікрочіпування полегшало діагностувати генетичні захворювання. Йдеться про такі хромосомні хвороби, які викликають розумову відсталість у народженої дитини та інші вади розвитку – як розумової, так і фізичної.

**Культуральний метод.** Культуральний метод є відмінністю мікробіологічних (бактеріологічних) досліджень. Наявність культурального методу у клінічній лабораторії дає основу виділення бактеріологічного відділення. Головна складова культуральних методів – культивування збудника на живильних середовищах, в організмі лабораторних тварин або на культурах тканин з метою виділення його у чистій культурі та подальшій ідентифікації;

Завдання, які вирішуються культуральним методом:

- етіологічне розшифрування інфекційного захворювання;
- ідентифікація біологічного виду бактерії-збудника;
- ідентифікація та диференціація вірулентних (патогенних) варіантів збудника (*C. diphtheriae*, *Cl. difficile*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*);
- контроль ефективності лікування, контроль лікування, контроль ерадикації інфекції (при туберкульозі, сифілісі, дифтерії, гострих кишкових інфекціях, сальмонельозах, черевному тифі, інфекції, викликаній *H. pylori*);
- виявлення та диференціація суперінфекції, рецидиву, реінфекції (при туберкульозі, інфекції, спричиненій *H. pylori*, інших хронічних інфекціях);
- контроль антибіотикорезистентності (первинної, вторинної) штамів збудників бактеріальних інфекцій;

Зростання інфекційного агента у культурі – єдиний надійний показник життєздатності патогену. Імунохімічні, молекулярно-біологічні, генетичні підходи дозволяють довести наявність патогену в біоматеріалі, але лише культуральний метод доводить його життєздатність. Методи, що не дозволяють диференціювати живі та «убиті» мікроорганізми (ПЛР, РІФ), слід обережно використовувати при контролі вилікуваності. Подібні дослідження необхідно проводити не раніше, ніж за кілька тижнів після закінчення етіотропної терапії, оскільки загиблі мікробні клітини або їх антигени можуть тривалий час зберігатися в організмі та виявлятися за допомогою цих методів.

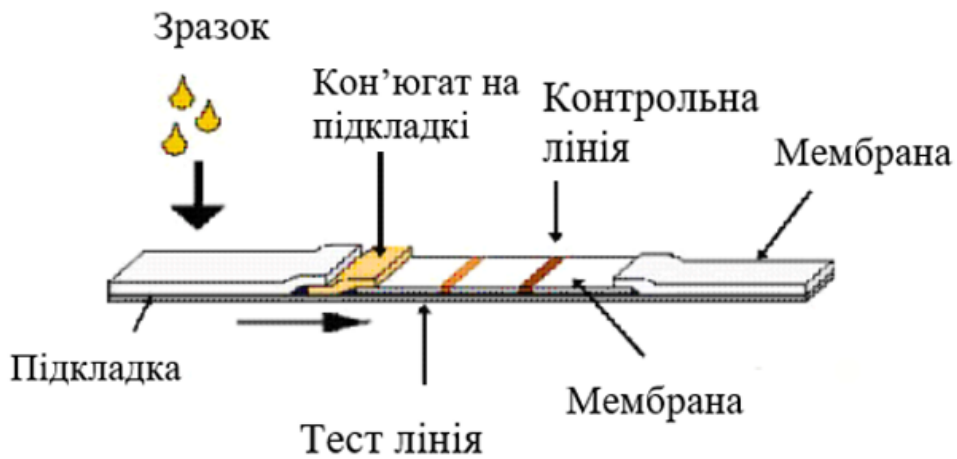
Успіх виділення чистої культури мікроорганізму визначається правильністю вибору живильного середовища та умов культивування. Універсального живильного середовища, використання якого гарантує виділення будь-якого мікроорганізму, не існує. Виявлення збудників у досліджуваному матеріалі, що містить значну кількість супутньої мікрофлори (наприклад, фекаліях), потребує застосування елективних поживних середовищ, призначених для виділення конкретних видів мікроорганізмів. Для деяких бактерій необхідні особливі умови культивування (мікроаерофільні – для кампілобактерів, анаеробні – для клостридій та бактероїдів, атмосфера, збагачена вуглекислим газом – для нейссерій). Все це слід враховувати під час направлення матеріалу в лабораторію.

**Методи експрес-аналізу.** Методи експрес-аналізу набули поширення за рахунок розробки, виробництва та використання портативних аналітичних пристроїв, властивості яких дозволяють їх застосування за місцем лікування пацієнта або надання невідкладної допомоги. Безперечний вигаш за такого способу виконання лабораторних досліджень – різке скорочення термінів отримання лабораторної інформації клініцистами. Лабораторне дослідження стає частиною безпосередньої допомоги пацієнтові. Однак при проведенні таких досліджень необхідно зберігати контроль з боку традиційних стаціонарних лабораторій для забезпечення якості та надійності результатів (ДСТУ ISO 22870 «Дослідження за місцем лікування. Вимоги до якості та компетентності»).

До методів експрес аналізу насамперед слід віднести імунохроматографію, яка розвивається виявлення як інфекційних агентів, і неінфекційних аналітів. Імунохроматографічні тести призначені для якісного виявлення різних аналітів у біологічних зразках. Ці методи імуноаналізу є добре налагодженим і дуже технологічним механізмом виробництва аналізу в різних умовах: point-of-care (POC) діагностика, самодіагностика та експрес діагностика. Переваги імунохроматографічних тестів добре відомі:

- Висока чутливість.
- Відносна простота виробництва тестів.
- Тривала стабільність – 12-24 місяців.
- Простота використання та інтерпретації.
- Можливість використання невеликих обсягів та кілька різних типів зразків.
- Можливість автоматизованого обліку результатів реакції.
- Відносно невисока вартість тесту.

В основі тесту лежить принцип взаємодії антигенів та антитіл. Тест є імунологічною смужкою, що складається з комбінації моноклональних антитіл і пористих матеріалів (мал. 18). У зоні тестової лінії на мембрані тесту закріплені специфічні антитіла проти шуканого аналіту. Аналізований зразок абсорбується поглинаючою ділянкою тесту. За наявності в зразку аналізованого шуканого антигену він зв'язується з нанесеним на смужку кон'югатом моноклональних антитіл, пов'язаних з наночастинками золота. Комплекс, що утворився, рухається по пористих матеріалах за рахунок капілярних сил і в тестовій зоні взаємодіє з моноклональними детектуючими антитілами. Імунохроматографічні експрес-тести активно застосовують для діагностики інфаркту міокарда на основі визначення комплексу біомаркерів: тропоніну, серцевого білка, що зв'язує жирні кислоти (СБСЖК), МВ ізоферменту креатинкінази (КК-МВ), міоглобіну. Дуже часто імунохроматографічні безприладні експрес-тести використовуються для якісного виявлення антигенів збудників різних інфекційних захворювань (інфекції шлунково-кишкового тракту, респіраторні інфекції тощо) у різних біологічних зразках з метою діагностики можливого інфікування.



Мал. 18. Схема будови імунохроматографічного тесту

Незважаючи на очевидну привабливість імунохроматографічних тестів, вони мають суттєві недоліки:

- Велика кількість хибно-позитивних результатів.
- Можливість фальшування результатів.
- Складність контролю якості.
- Перехресне реагування аналітів у мультиплексних тестах.
- Високі коефіцієнти варіації (CV-10-20%), проблеми відтворюваності від тесту до тесту.

## 7. ПОСТАНАЛІТИЧНИЙ ЕТАП ЛАБОРАТОРНОГО АНАЛІЗУ

Постаналітичний етап лабораторного аналізу можна поділити на лабораторну та позалабораторну частини.

### *Внутрішньолaboratorна частина постаналітичного аналізу*

**Перевірка результатів аналізу спеціалістом лабораторії.** Перевірка кваліфікованим фахівцем лабораторного результату аналізу є основним елементом внутрішньолaboratorної частини постаналітичного етапу. Перевірка проводиться на предмет аналітичної достовірності результату аналізу, правдоподібності, а також зіставлення результату з референтними інтервалами, раніше проведеними аналогічними дослідженнями або паралельно проведеними іншими дослідженнями у того ж хворого. Найкращим джерелом для референтних інтервалів міжнародні експерти визнають загальновизнані книги з

лабораторної медицини (наприклад, Tietz Textbook of Clinical Chemistry). Корисно зіставити ці інтервали з інтервалами, запропонованими виробником аналітичної системи. Якщо з якоїсь причини в цій книзі немає аналізу або представленої інформації недостатньо, можна використовувати референтні інтервали, пропоновані виробником аналітичної системи.

Формування лабораторного укладання. Верифікація результатів дослідження у лабораторіях проводиться лікарями клінічної лабораторної діагностики. У загальному вигляді використовується наступний алгоритм перевірки: - результати внутрішнього контролю якості; правильність занесення даних до ЛІС; адекватність даних діагностичної задачі; адекватність даних індивідуальним особливостям пацієнта; оцінка референтних інтервалів У разі відсутності проблемних зон, лікар верифікує дані. У разі виявлення відхилень лікар приймає одне з наступних рішень: повторна постановка дослідження; внесення коригувань у дані у разі технічної помилки; внесення інформації до ЛІС – інтерпретація результатів, коментар до результату дослідження; вибраковування даних із відповідним коментарем на бланку.

Форматування бланків звітів заслуговує на особливу увагу співробітників лабораторії. Добре використовувати групування результатів аналізів за патофізіологічним принципом і, крім цифрового, графічне представлення даних щодо референтних меж, що значно спрощує трактування результатів. В цілому, клініцист повинен бути в змозі, глянувши на бланк, швидко отримати найбільш важливу інформацію, не відволікаючись на кількість нулів після коми, одиниці чи неактуальних референтних інтервалів.

Якщо результати аналізів згруповані на бланку правильно, наведено відповідні референтні величини, виділено результати, що перевищують референтні величини, і додатково дано висновок про можливі причини, що викликали патологічні відхилення в результатах, то це буде тільки сприяти ефективному використанню лабораторних досліджень у лікувально-діагностичному. зрештою, покращить якість надання медичної допомоги пацієнтам.

На етапі формування лабораторного висновку слід враховувати чинники, що перешкоджають визначенню аналіту. Ступінь впливу зовнішніх факторів часто залежить від методу виміру аналіту. Якщо на преаналітичній стадії сумнівну пробу було прийнято на дослідження, то при остаточній перевірці результатів у бланку звіту слід якимось чином виділити аналіти, на вимірювання яких ці фактори могли вплинути. Подібні коментарі в остаточному звіті про лабораторне дослідження необхідні.

Важливими факторами, здатними змінити лабораторні результати, є *медикаменти та їх метаболіти*. Вловити таку інтерференцію в оцінці результатів – одне із завдань лікаря клінічної лабораторної діагностики. Однак це завдання залишається практично мало розв'язним через величезну різноманітність лікарських засобів, пропонованих сучасним фармацевтичним ринком, і через появу в крові та сечі хворого різноманітних метаболітів ліків, які найчастіше перешкоджають проведенню вимірювання. Можна спробувати спільно розробити інформаційний матеріал щодо впливу медикаментів, що використовуються в клініці, на результати лабораторних досліджень і постійно доповнювати його новими відомостями в міру їх появи. За наявності сучасних медичних та лабораторних інформаційних систем це завдання стає здійсненним. Спираючись на госпітальну інформаційну систему, де розписані всі препарати, що приймаються пацієнтом, програма, інтегрована в лабораторну інформаційну систему, буде проводити автоматичну перевірку лабораторних результатів перед формуванням звітів щодо пацієнтів та за необхідності забезпечувати їх коментарями типу: «Подібна зміна концентрації може бути пов'язана з ...», які у свою чергу перед роздруком підтверджуватиме фахівець лабораторної діагностики.

Дуже важливо вказати у звіті про лабораторне дослідження час його відправлення з лабораторії. Цей критерій обов'язково необхідно враховувати, особливо якщо аналізи виконувалися за невідкладними показаннями, оскільки затримка лабораторією результатів може серйозно вплинути на своєчасність надання допомоги пацієнту.



Ця частина етапу закінчується підписом (авторизацією) бланка звіту, тобто. формуванням кінцевого продукту лабораторного процесу та передачею його клініцисту. Керівництво лабораторії є відповідальним за вид подання звітів про результати досліджень. Вигляд подання звіту (електронний або на паперовому носії) та спосіб передачі з лабораторії мають бути узгоджені з користувачами лабораторних послуг. Існує кілька способів передачі бланків звітів. Централізовані лабораторії часто використовують кур'єрів. Тут особливо важливо організувати чітку систему реєстрації часу доставки та ефективний зворотний зв'язок із замовниками лабораторних досліджень. Після верифікації даних у лабораторії вони стають доступними у адміністраторів, які видають їх фізичним особам згідно з регламентом адміністраторів медичних центрів. Видача результатів досліджень юридичним особам проводиться у відповідність до договорів, дані передаються юридичним особам електронної пошти з дотриманням шифрування та захисту даних. Копії або електронні версії звітів про результати повинні зберігатися в лабораторії таким чином, щоб забезпечити швидке запитання інформації. Тривалість періоду зберігання може змінюватись, проте повідомлені результати повинні зберігатися так довго, як це диктується медичними потребами або національними, регіональними або місцевими правилами.

**Консультавання лікаря за результатами лабораторних досліджень.** У разі отримання значного відхилення у результатах життєво важливих параметрів їх негайно обговорюють із лікарями-клініцистами. За необхідності дослідження повторюють. Аналогічно надходять і щодо інших результатів, які викликають сумніви.

Корисно буває сформулювати та використовувати поняття «критична величина аналіту», за якою стоїть необхідність негайних дій (табл. 2). Виявивши таку величину лікар клінічної лабораторної діагностики повинен негайно повідомити про це клініцисту, що в окремих випадках може врятувати життя пацієнту.

Форми та зміст висновків лікарів клінічної лабораторної діагностики за результатами лабораторних досліджень необхідно обговорювати разом із клініцистами.

Трактування лабораторних досліджень проводять і в лабораторії, і в клінічних відділеннях. Тут фахівці лабораторної діагностики та клініцисти спільно мають виробити загальні підходи до цілої низки проблем, наприклад:

- проблема різноманіття чинників, які впливають на результати досліджень;
- проблема біологічної варіації аналітів;
- поняття «референтний інтервал» та різноманіття цих інтервалів (стаття, вік, вагітність та інше);
- поняття про клінічно значущі відхилення лабораторних результатів;
- поняття про діагностичну чутливість та специфічність лабораторних тестів.

Таблиця 2

**Критичні величини результатів лабораторних досліджень, які потребують негайних дій (Davis, Mass, 1999)**

<b>Аналіт</b>	<b>Критична величина</b>
<b>Гематологія</b>	
Гематокрит	<14% або >60%
Лейкоцити	<2,0 · 10 <sup>9</sup> /л у нового пацієнта або різниця в 1,0 · 10 <sup>9</sup> /л проти попереднім аналізом при рівні 4,0 · 10 <sup>9</sup> /л >50,0 · 10 <sup>9</sup> /л у нового пацієнта
Мазок крові	Наявність лейкомічних клітин (програнулоцитів чи бластів)
Тромбоцити	<20,0 · 10 <sup>9</sup> /л або >1000,0 · 10 <sup>9</sup> /л
Ретикулоцити	>20%
Протромбіновий час	>40 сек
<b>Мікробіологія</b>	
Культура крові	Позитивна
Забарвлення за Грамом ліквору, плевральної, синовіальної та інших рідин	Позитивна
<b>Біохімія</b>	

аборубін	>300 мкмоль/л (новонароджені)
тропонін Т	>0,1 нг/мл
креатинкіназа-МВ	>6 % від активності загальної креатинкінази
кальцій	<1,5 ммоль/л або >3,2 ммоль/л
глюкоза	<2,22 ммоль/л або >27,75 ммоль/л
фосфати	<0,32 ммоль/л
калій	<2,5 ммоль/л або >6,5 ммоль/л
натрій	<120 ммоль/л або >160 ммоль/л
бікарбонати	<10 ммоль/л або >40 ммоль/л
D-димер	>500 мкг/мл

Результати лабораторних досліджень схильні до впливу біологічної та аналітичної варіації. Розмір біологічної варіації залежить від цілого комплексу чинників. В цілому, висока якість проведення преаналітичної стадії лабораторного дослідження знижує біологічну варіацію, перш за все, за рахунок стандартизації умов взяття матеріалу (наприклад, взяття крові в один і той же час дня, після відпочинку, натщесерце, з урахуванням положення тіла, з одного і того ж тривалістю накладення джгута). Але навіть, якщо взяття матеріалу для аналізів проводиться в стандартних умовах, результати повторних вимірювань (наприклад, щоденні визначення концентрації глюкози в крові натще) підкорятимуться законам нормального розподілу, групуючись навколо «типової» для даного індивідуума величини. Внутрішньоіндивідуальна варіація спостерігається в однієї і тієї ж людини внаслідок впливу біологічних ритмів, наприклад (концентрація кортизолу в крові вранці та ввечері), способу життя (рівень фізичної активності, харчування, прийом алкоголю, ліків і т.д.). Расові, вікові та статеві відмінності концентрації аналітів – типовий приклад міжіндивідуальної варіації. Це явище призводить до різноманіття референтних інтервалів для одного аналіту. Зокрема, цим пояснюється відмінність концентрації статевих стероїдів у жінок та чоловіків, концентрації тироксину в крові у популяції здорових вагітних жінок від такої у здорових жінок, або активності лужної фосфатази у крові у підлітків та дорослих.

## **Позалабораторна частина постаналітичного аналізу**

Позалабораторна частина постаналітичного етапу – це, перш за все оцінка лікарем клінічної значущості інформації про стан пацієнта, отриманої в результаті лабораторного дослідження. Авторизований звіт з результатами лабораторних досліджень надходить клініцисту, який клінічно інтерпретує отриману лабораторну інформацію, зіставляє її з даними власного спостереження за пацієнтом та результатами інших видів досліджень та використовує її для надання пацієнту медичної допомоги. Доступність консультацій з боку фахівців лабораторії та участь останніх в обговоренні окремих клінічних випадків – обов'язкова практика для лабораторії будь-якого типу. Корисно ввести в практику запис історії хвороби результатів оцінки лабораторних досліджень, що полегшить оцінку ефективності використання лабораторної інформації.

Терміни виконання лабораторних тестів можуть серйозно впливати на якість надання медичної допомоги пацієнтам, особливо, якщо вони проводяться за невідкладними або життєвими показаннями. Лікарі повинні знати терміни видачі всіх видів аналізів. Крім того, у лікувальному закладі має бути налагоджений діалог з провідними клініцистами та адміністрацією щодо визначення ефективних термінів виконання аналізів відповідно до медичних потреб та вартості аналізів. Так, для невідкладних досліджень прийнятний час від доставки матеріалу до лабораторії до отримання результатів – одна година. Для досліджень за життєвими показаннями (найчастіше це такі аналіти, як гемоглобін, гематокрит, рН/гази крові та показники кислотно-основного стану, натрій, калій, хлориди, лактат, глюкоза), коли пацієнт знаходиться, наприклад, в операційній або відділенні інтенсивної терапії, цей час скорочується до 5 хвилин. Терміни виконання звичайних та термінових тестів потрібно регулярно контролювати, і це має бути частиною інспекційних перевірок лабораторії.

Практика отримання клініцистом результатів по телефону має бути обмежена та в мінімальні терміни підтверджена паперовою або електронною копією за підписом відповідального лабораторного фахівця.

Клінічна інтерпретація результатів лабораторних досліджень та їх використання для вирішення завдань, що стоять перед клініцистом (діагноз, стеження за станом пацієнта та розвитком захворювання, зміна схеми лікування), важливий, але не єдиний показник ефективного використання лабораторних досліджень. Більше значення має визначення критеріїв впливу цієї інформації на якість медичної допомоги пацієнтам. Проведення оцінки такого впливу потребує значних інтелектуальних зусиль та витрат часу. Разом з тим, тільки вона дозволяє реально оцінити внесок лабораторії в лікування пацієнта. Тут можна виділити такі основні критерії:

- вплив лабораторних аналізів на зменшення кількості ускладнень під час лікування пацієнтів;
- скорочення терміну перебування пацієнта у відділенні інтенсивної терапії чи реанімації;
- зменшення витрат на медикаменти групи пацієнтів, яким проводилися ті чи інші лабораторні тести;
- скорочення тривалості перебування пацієнта у стаціонарі, загалом, та окремих груп пацієнтів, яким проводилися ті чи інші лабораторні тести;
- скорочення смертності чи інвалідизації внаслідок впровадження нових лабораторних тестів.

Спільно з клініцистами, спираючись на міжнародні стандарти та рекомендації, потрібно написати, затвердити у керівника лікувально-профілактичного закладу інструкцію з якості (внутрішній стандарт) проведення постаналітичного етапу лабораторного дослідження та дотримуватись її у повсякденній роботі. Цей документ буде основою як для забезпечення, так і для контролю якості проведення цієї стадії.

## **8. КОНТРОЛЬНІ МАТЕРІАЛИ**

### ***Контрольні питання:***

1. Які процеси лабораторного дослідження виконуються на преаналітичному, аналітичному та постаналітичному етапах?
2. Які антикоагулянти застосовуються і для яких досліджень?

3. Для яких лабораторних досліджень необхідно брати кров натщесерце?
4. Основні принципи взяття матеріалу для цитологічних, коагулологічних, мікробіологічних досліджень?
5. Що таке стандартна операційна процедура, складіть СОП для процедурної сестри, яка бере кров з вени?
6. Які основні процедури при налаштуванні лабораторного мікроскопа для морфологічних досліджень в лабораторії?
7. Що відрізняє біохімічне дослідження в ручному виконанні, напівавтоматичне і автоматичне?
8. Оцініть переваги і обмеження імуноферментного і імунофлуоресцентного аналізу.
9. Які умови повинні виконуватися, щоб позначити метод як референтного?
10. Які дії необхідно виконати фахівцеві клінікодіагностичної лабораторії при отриманні критичного значення аналізу?

**Тести:**

1. Цитрат і оксалат стабілізують плазму за рахунок
  - А) зв'язування іонів кальцію
  - Б) активації антитромбіну
  - В) попередження активації фактора Хагемана
  - Г) інгібування тромбопластину
  - Д) інгібування акцелератора
  
2. Оцінка результатів лабораторного аналізу відбувається на етапі
  - А) преаналітичний
  - Б) аналітичний
  - В) постаналітичний
  - Г) преаналітичному і постаналітичному
  - Д) на будь-якому з лабораторних етапів

3. У пацієнтів в реанімаційному відділенні не можна брати кров з:

- А) вени
- Б) артерії
- В) підключичного катетера
- Г) пальця
- Д) мочки вуха

4. Для дослідження коагуляції неприпустимо в якості антикоагулянта використання:

- А) ЕДТА
- Б) цитрату натрію
- В) оксалату натрію
- Г) гепарину
- Д) stad-систем зі стабілізатором, що включає цитрат натрію, трифосаденін, теофілін і дипіридамомл

5. Не допускається при взятті крові на коагулограму:

- А) використовувати вакуумний пробурки вакуети, наповнені цитратом
- Б) використовувати пластикові пробірки з цитратом
- В) використовувати силіконовані пробірки з цитратом
- Г) наповнювати пробірки з цитратом за допомогою шприців для ін'єкцій
- Д) забирати кров з вени за допомогою голки

6. Бактеріовиділення при туберкульозі діагностується мікроскопією препаратів мокротиння, забарвлених по:

- А) Романовському-Гімза
- Б) Папаніколау
- В) Цилю-Нільсену
- Г) Лейшману
- Д) Мак Грюнвальду

7. Щоб звільнитися від домішки" шляховий " крові, що потрапляє в результаті пошкодження голкою кровоносних судин, розташованих в області епідурального простору, потрібно:

- А) відцентрифугувати ліквор
- Б) пропустити ліквор через фільтр
- В) перші 3-5 крапель ліквору не брати
- Г) провести ліквороферез
- Д) додати в ліквор тромбін Для активації згортання

8. Правильність вимірювання в клінічній біохімії визначають з використанням:

- А) калібратора
- Б) проб пацієнта
- В) атестованої контрольної сироватки
- Г) неатестованої контрольної сироватки
- Д) державних стандартів

9. До методів термінової лабораторної діагностики слід віднести визначення:

- А) активності кислої фосфатази
- Б) білкових фракцій
- В) пухлинних маркерів
- Г) загального холестерину
- Д) білірубину у новонароджених

10. При постановці кількісного методу ІФА отримана неправильна форма графіка калібрувальної залежності. З представленого списку тільки одна не може бути причиною цієї помилки. Вкажіть яка:

- А) неправильно приготований розчин стандарту



- Б) помилка в послідовності при внесенні стандартів
- В) неправильна промивка і видалення розчину з осередків
- Г) забруднення дна осередків мікропланшету
- Д) висока температура повітря в приміщенні лабораторії

**Відповіді:**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
А	В	В	А	Г	В	В	В	Д	Д

## ЗМІСТ

1. Преаналітичний етап лабораторного аналізу.....	4
2. Взяття крові для досліджень.....	20
3. Отримання матеріалу для цитологічного дослідження.....	28
4. Приготування препаратів із крові, сечі, мокротиння, калу, ліквору, випітних та інших рідин для мікроскопії.....	36
5. Аналітичний етап лабораторного аналізу.....	44
6. Методи клінічних лабораторних досліджень.....	52
7. Постаналітичний етап лабораторного аналізу.....	102
8. Контрольні матеріали.....	109

## РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

### Основна

1. Лаповець Л.Є., Лебедь Г.Б., Ястремська О.О. Клінічна лабораторна діагностика: підручник. – Всеукраїнське спеціалізоване видавництво «Медицина», 2019. – 472 с.: 32 кольор. вкл.
2. Танасійчук І.С., Луньова Г.Г., Завадецька О.П., Олійник О.А., Кривенко Є.О., Колядінцев В.В. Підготовка та оцінювання компетентності персоналу клініко-діагностичних лабораторій відповідно до вимог міжнародних стандартів: монографія. Київ, 2019. – 71 с.
3. Фещенко Ю.І., Журило О.А., Барбова А.І. Лабораторна діагностика туберкульозної інфекції навчальний посібник. - Всеукраїнське спеціалізоване видавництво «Медицина», 2019. – 304 с.: 4 кольор. вкл.
4. Л.Є. Лаповець, Г.Б. Лебедь, О.О. Ястремська та ін. Клінічна лабораторна діагностика: підручник /; за ред. Л.Є. Лаповець. – 2-е вид., стер. – К. : ВСВ «Медицина», 2021. – 472 с.

### Додаткова

5. Манастирська, О.С. Клінічні лабораторні дослідження: Вінниця: Нова книга, 2017.
6. Lee NY. Types and frequencies of preanalytical errors in the clinical laboratory at the University Hospital of Korea. Clin Lab 2019; 65: 10.7754/Clin.Lab.2019.190512.
7. Kulkarni S, Ramesh R, Srinivasan AR, Silvia CRWD. Evaluation of preanalytical quality indicators by Six Sigma and Pareto's principle. Indian J Clin Biochem 2018; 33: 102–107.
8. Lima-Oliveira G, Volanski W, Lippi G, Picheth G, Guidi GC. Preanalytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. Scand J Clin Lab Invest 2017;77:153–163.
9. Almatrafi AA. Preanalytical Errors: A Major Issue in Medical Laboratory. Acta Sci Med Sci 2019;3:93-95.

10. Giavarina D, Lippi G. Blood venous sample collection: Recommendations overview and a checklist to improve quality. *Clin Biochem* 2017;50:568-573.