

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця
Кафедра сучасних технологій медичної діагностики та лікування

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ

ОСНОВИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ (для лікарів клінічних спеціальностей)

**Навчально- наочний посібник
для студентів медичних факультетів**

Київ 2022

УДК 612+616-079(-075.8)
ББК 53.43я7
К49

Натрус Л.В. Основи лабораторної діагностики (для лікарів клінічних спеціальностей). Навчально-наочний посібник для студентів медичних факультетів. – Київ, НМУ імені О.О.Богомольця.- 2022.- 51 стор.

Рецензенти:

Панова Т.І. – завідувачка кафедри патофізіології НМУ імені О.О.Богомольця, д.мед.н., професор

Зайченко Г.В. – завідувачка кафедри фармакології НМУ імені О.О.Богомольця, д.мед.н., професор

Посібник створений за розділами змістових модулів відповідно до освітньої програми спеціальності 222 «Медицина» та робочої програми навчальної дисципліни «Лабораторна діагностика» для студентів 4 курсу. Наведені матеріали 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 посібнику багато ілюстрацій та схем, що сприяє найбільш ефективному засвоєнню матеріалу.

При складанні посібника використані нормативні матеріали та рекомендації, які були розроблені та впровадженні в роботу клініко-діагностичної лабораторії Університетської клініки. Матеріали рекомендацій для лікарів та середнього персоналу ілюстровані лікарем-лаборантом Осадчук Ю.С.

Посібник рекомендований для використання в навчальному процесі на засіданні кафедри 25.08.2022, протокол засідання № 8.

ТЕМА 1

ВЗАЄМОДІЯ ЛІКАРЯ-КЛІНІЦИСТА І СПЕЦІАЛІСТА КЛІНІКО-ДІАГНОСТИЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

Діагностичні тести, необхідні для встановлення діагнозу, виконуються в лабораторії на замовлення клініцистами, їх результат надається клініцисту (або безпосередньо пацієнту), але із обов'язковою інтерпретацією отриманого результату виключно **лікарем**. Вклад лабораторної служби у прийнятті клінічних рішень залежить не тільки від якості роботи самої лабораторії, а й від вірного запиту клініциста на виконання тестів та інтерпретації їх результатів. Існує абсолютна кореляція між рівнем взаємодії клініцистів із лабораторними працівниками та якістю медичної допомоги.

Формування діагностичного припущення відбувається в свідомості лікаря-клініциста в результаті накопичення інформації про пацієнта і його стан, скарг, анамнезу, даних лікарського огляду, включаючи динамічне спостереження. Для підтвердження попереднього діагнозу, як правило, клініцисту потрібні результати досліджень пацієнта різними **об'єктивними методами** (рис. 1.1).

Арсенал методів, які надають максимально об'єктивні відомості про стан організму у цифрах та/або зображенні, постійно зростає та удосконалюється.

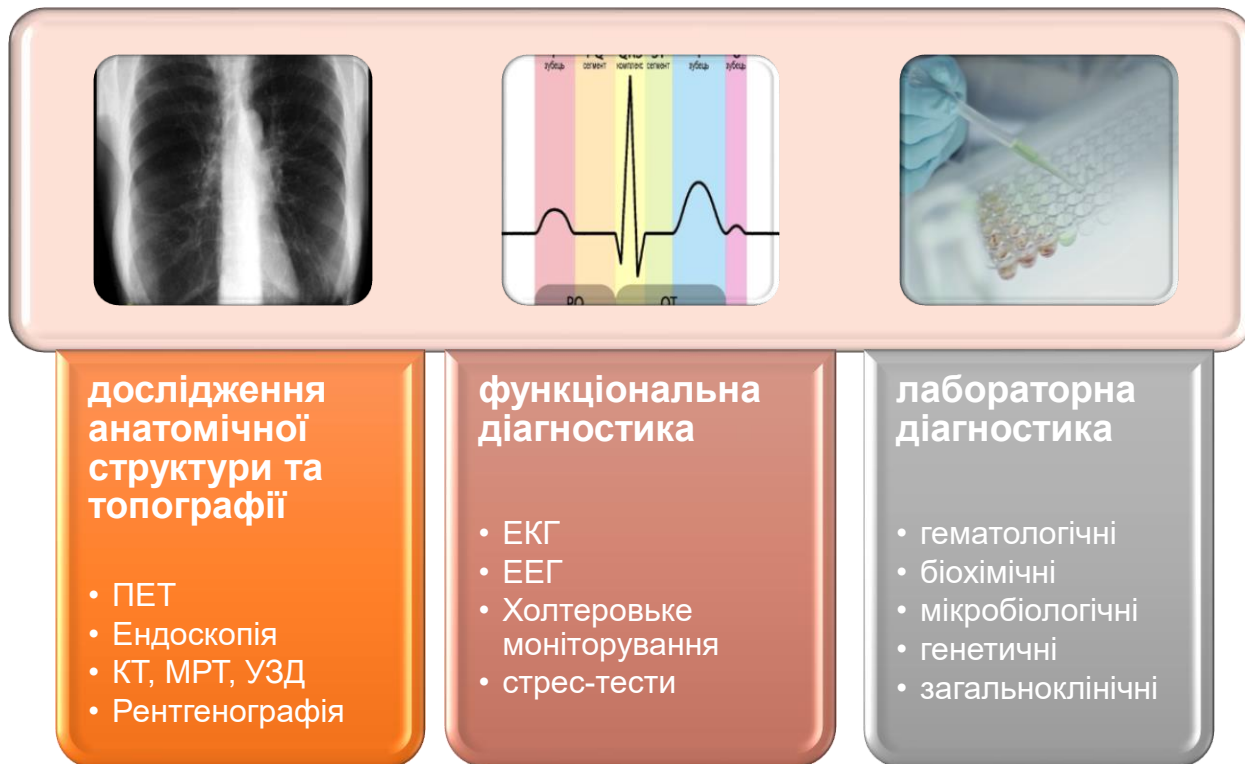


Рис. 1.1. Методи об'єктивних (інструментальних) досліджень в медицині.

Виділяють методи оцінки **анатомічної структури та топографії** органів (променеві – рентгенологічні, КТ, МРТ; УЗД; радіонуклідні – позитронно-емісійна томографія; ендоскопічні). Сучасні апарати спроможні формувати звіт у вигляді 3D зображення, що полегшує визначити модель зміни структури.

Група методів **функціональної діагностики** надає інформацію про особливості функціонування органів та систем в динаміці спостереження, або на тлі навантаження (електрокардіограма, холтеровське моніторування, електроенцефалографія, доплер-зображення судин, стрес-тести тощо).

До методів об'єктивного вимірювання біохімічного та клітинного складу біологічного матеріалу пацієнтів відноситься і **лабораторна діагностика**.

Спеціалізації лабораторної діагностики

В Україні галузь лабораторної діагностики включає ряд спеціалізацій (рис.1.2), відповідно до яких формуються посади лікарів-лаборантів. В клініко-діагностичній лабораторії (КДЛ) штатний розклад і посади лікарів-лаборантів формуються в залежності від виду досліджень, які виконуються в

цій лабораторії. Розподіл кількості спеціалістів в галузі обумовлений попитом клініцистів до вказаних видів досліджень.



Рис. 1.2. Орієнтовний розподіл долі спеціалізацій в галузі лабораторної медицини.

В спектр найбільш популярних досліджень з **клінічної лабораторної діагностики** входять: дослідження в гематології та імуногематології, загальноклінічні методи лабораторних досліджень фізико-хімічних та мікроскопічних властивостей біологічних рідин та екскретів, цитологічна діагностика пухлин, передпухлинних станів та інших патологічних процесів, що мають у своїй основі морфологічний субстрат. Часто в відділах загальноклінічних досліджень виконують лабораторну діагностику паразитарних захворювань.

Клінічна біохімія надає клініцистам дані щодо біохімічних тестів, за якими аналізують вміст субстратів та активність ферментів, які є показниками різних видів обміну речовин. Також клінічні біохіміки виконують дослідження системи гемостазу - тести з коагулограми.

Основним шляхом дослідження **лабораторної імунології** є природне комплементарне поєднання комплексу антиген-антитіло, яке ідентифікується завдяки маркеру (мітка). На цьому принципі створений метод імуноферментного аналізу (ІФА) та імунохемілюмінесцентний аналіз (ІХЛА), специфічність якого вища, ніж ІФА. Ці методи використовують для виміру в біологічній рідині гормонів, онкомаркерів, специфічних антитіл тощо.

Мікробіологічні (вірусологічні) найбільш поширені в бактеріологічних лабораторіях і мають на меті дослідження біологічного матеріалу, підозрюваного на вміст певного патогенного біологічного агенту. Виконання вказаних аналізів вимагає певної інфраструктури, специфічного обладнання, боксів біозахисту, тому, як правило, ці лабораторії відокремлені. Якщо результатом вірусологічного дослідження є ідентифікація РНК/ДНК вірусу, тоді використовується молекулярно-генетичний метод, заснований на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР).

Об'єктом вивчення **лабораторної генетики** є зміна ДНК, асоційована із спадковими захворюваннями та мутаціями. В цих лабораторіях використовують методи ПЛР, цитогенетичні (флуоресцентна гібридизація *in situ*), секвенування тощо для детекції хромосомних аномалій.

Звертаючись до лабораторії, клініцист має розуміти **основні принципи методів та їх характеристики** (чутливість, специфічність, відтворюваність та правильність) (рис. 1.3) і, відповідно, до цього формувати запит.

Ці дані можна дізнатися у фахівця лабораторії.

Чутливість - відображає ймовірність, з якою можна визначити наявність досліджуваної речовини в дослідному зразку. Високе значення чутливості означає, що тест правильно класифікує зразок без заданого стану як негативний частіше, ніж тест, що має нижчу чутливість.

Специфічність - це характеристика вибіркості тест-системи. Це відсоток істинно негативних серед усіх зразків, що не мають певного стану.

Відтворюваність - це здатність показувати однаковий результат при повторному дослідженні однієї і тієї ж проби в одній лабораторії.

Правильність - відповідність середнього значення результатів повторних визначень одного і того ж зразка з істинною величиною вимірюваного параметра. Кількісною мірою правильності виступає оцінка значення систематичної похибки.



Рис.1.3. Схематичне зображення характеристики методів

Наприклад, за даними мета-аналізу (Larić et al, 2020) доведено, при діагностиці гострого бактеріального запалення показник швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ) має чутливість 0,77%, специфічність 0,59% і вважається «застарілим» тестом, який втратив свою цінність.

С-реактивний протеїн при цьому має також невисокі показники: чутливість 0,86%, специфічність 0,67%.

Методи ПЛР мають високу чутливість – до 95%, оскільки для відтворення методики достатньо одної молекули ДНК.

Метод ІФА має специфічність до 80%, ІХЛА – до 90%.

Відтворюваність візуального підрахунку та диференціювання клітин крові на склі у мазку дуже низька, не більше 70%, оскільки суттєво залежить від багатьох факторів, починаючи від фіксації клітин, фарбування, оптики мікроскопу, досвіду спеціаліста, кількості клітин для аналізу і т.п. Відтворюваність вимірювання клітин гематологічним аналізатором досягає 98-99%.

Як клініцист може бути впевнений у роботі лабораторії?

Усі заклади, які мають ліцензію від МОЗ України на проведення лабораторних досліджень за вказаною в ліцензії спеціалізацією – гарантують свою якість, оскільки, за ліцензійними умовами, є обов'язковим регулярне проведення **внутрішньолaborаторного контролю якості та зовнішньої оцінки якості досліджень**. Додатковим підтвердженням якісної послуги може бути сертифікат від незалежної агенції про впроваджену в роботу лабораторії систему якості відповідно міжнародним стандартам ДСТУ ISO 15189:2015.

Водночас, якість послуги лабораторії клініцист визначає по ряду критеріїв: зручність та інфраструктура при обслуговуванні пацієнта, швидкість і коректність оформлення результату, вартість послуги тощо.

Важливим критерієм якісної роботи лабораторії є готовність спеціалістів лабораторії надавати консультації клініцистам з приводу отриманих результатів і інтерпретації даних. Оскільки, лише в ході діалогу клініциста із фахівцем лабораторії формується як індивідуальний обсяг знань спеціалістів, так і колективний досвід раціонального і ефективного застосування арсеналу лабораторних тестів.

В обов'язок фахівця лабораторії входить виконання дослідження для надання достовірної інформації про клітинний, біохімічний, молекулярний склад проб біологічних матеріалів, отриманих у хворого, а також про відповідність показників референтному значенню.

Спеціаліст лабораторії не має права відмінити призначене клініцистом дослідження або замінити його на інше, без поради із лікарем, який оформив запит. Але надати колегіальну пораду до вказаного спектру або рекомендацію щодо доцільності призначення того чи іншого аналізу спеціаліст лабораторії може обговорювати із колегою-клініцистом у вигляді продуктивного діалогу.

Яка зона відповідальності клініциста?

Клініцист визначає коло необхідних пацієнту тестів, виходячи зі свого діагностичного припущення, і **несе повну відповідальність** за обґрунтованість призначених аналізів. Також обов'язком клініциста є **підготовка пацієнта** до лабораторного дослідження та організація процесу **отримання відповідних біоматеріалів пацієнта**.

В багатьох джерелах, на сайтах лабораторій, є рекомендації, як організувати збір матеріалу для дослідження, які використати пробірки (контейнери, системи) та які поради надати пацієнту з підготовки до узяття. Також консультацію із цього приводу клініцист може отримати безпосередньо в лабораторії, з якою він працює.

Як організовано лабораторне дослідження

Лабораторне дослідження має три основних етапи/фази: преаналітичний, аналітичний, постаналітичний. Деякі автори виділяють додатково пре-преаналітичний, та пост-постаналітичний (рис.1.4).

Преаналітичний етап включає всі процеси, починаючи з моменту, коли лікар робить запит в лабораторію, до моменту, коли зразок аналізується в лабораторії. За думкою багатьох дослідників, саме на цьому етапі є вкрай важливим співпраця спеціалістів. Оскільки, порушення правил збору матеріалу виключає сенс аналізу проби взагалі.

Під час **аналітичної** фази (безпосереднього виконання тесту в лабораторії) за думкою авторів моделі, є корисним присутність клініциста (наприклад при мікроскопії, або виконанні експрес-тесту), для уточнення або зміни напрямку алгоритму. На **постаналітичному** етапі важливим є не лише обговорення між клініцистом та лабораторним персоналом результатів аналізів, а й відгук клініциста про результати до лабораторії.

На **преаналітичному етапі клініцист** готує пацієнта, пояснює йому цінність дослідження, розповідає про процедуру, надає рекомендації щодо режиму харчування й фізичної активності напередодні тестування, визначає готовність пацієнта до здачі зразку, якщо рекомендує звернутися в лабораторію в день огляду.

Важливим є не лише запит правильних тестів, а й вірно заповнений (розбірливими літерами) лист направлення до лабораторії, де клініцист має вказати усю необхідну інформацію про пацієнта. Якщо лікар має серйозні підстави (показання) і вважає необхідним **термінове** звернення до лабораторії пацієнта, який не дотримувався правила підготовки до аналізу – лікар обов'язково це вказує у направленні і має обґрунтувати свою думку під час експертизи направлень.

Клініцист також контролює збір та транспортування зразків, який часто здійснюється середнім медичним працівником.

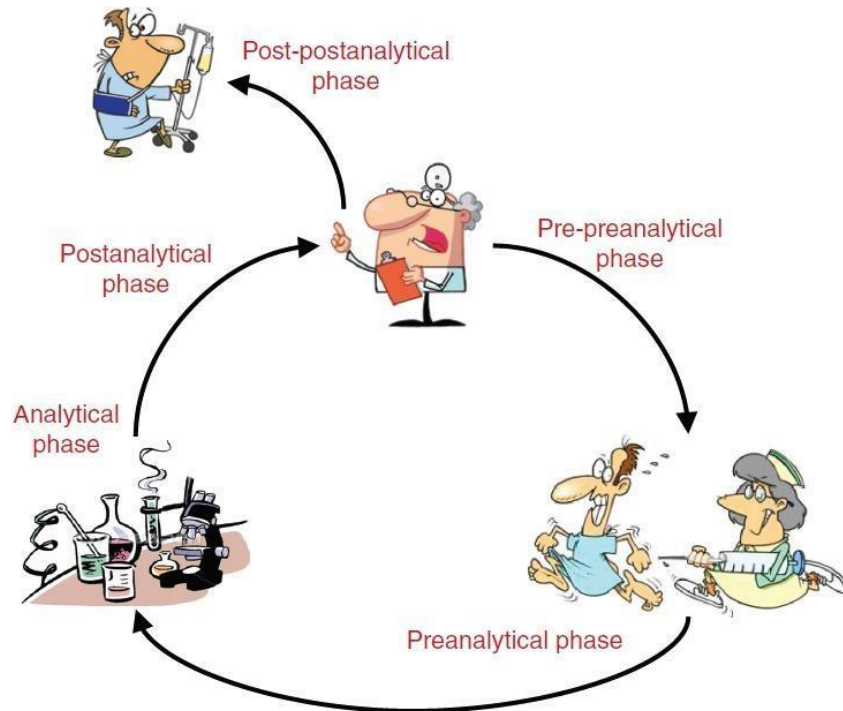


Рис. 1.4. Етапи лабораторного дослідження (Lippi, 2018)

Для кожного виду дослідження біологічний матеріал збирається у чітко визначену ємкість (пробірку, контейнер). Важливою умовою під час забору крові є короткочасне накладення джгута, особливо для дослідження коагулограми.

Пробірки для крові мають різний колір кришечок, які **маркують** щоб вказати вміст речовини, яка формує із крові рідину для дослідження. Частіше за все це різні види антикоагулянту, який запобігає згортанню крові (утворення згустку та агрегації клітин).

Кожний вид наповнювача пробірки забезпечує перетворення крові на специфічну речовину для дослідження лише конкретним методом і **не може бути використаним для декількох методик**. Послідовність наповнення пробірок також має значення.

Для найбільш ефективного перемішування крові із речовиною у пробірці, медсестра повинна узяти певну кількість крові (до вказаної на пробірці мітки) і зробити до 5-10 плавних ротацій (перевертань пробірки на 180 градусів), запобігаючи струшуванню та руйнуванню клітин (рис. 1.5).

Як відбувається співпраця фахівців при наданні матеріалу до лабораторії

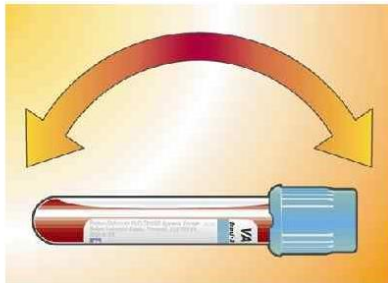
Медсестра, що проводила забір біоматеріалу, заповнює графу «час взяття матеріалу» і обов'язково - «ПІБ медсестри» із підписом поряд. Медсестра забезпечує транспортування пробірок до лабораторії лише у контейнері із кришкою та вертикальному штативі. Бланки направлення приносяться разом, але у контейнер їх класти збороняється.

Лікар, який направив пацієнта, обов'язково має проконтролювати усі дії медсестри, оскільки збір біоматеріалу та його спрямування в лабораторію – це зона відповідальності лікаря-клініциста, а не медсестри.

При виявленні невідповідностей доставленого біоматеріалу призначеному дослідженню та/або порушенню процедури узяття зразків, термінів доставки, реєстратор лабораторії визначає порушення, вписує в «Журнал дефектури забору біологічного матеріалу», відмовляє у дослідженні та інформує про це співробітника клінічного відділення, що доставив матеріал і лікаря, що замовив дослідження.

Перемішування пробірок

Пробірки треба перемішувати відразу після їх заповнення кров'ю та вилучення із голготримача



-  3 - 4 рази
-  5 раз
-  5 раз
-  8 - 10 раз
-  8 - 10 раз

ретельно та обережно зробити ротації на 180 градусів, для запобігання утворення згустку або гемолізу

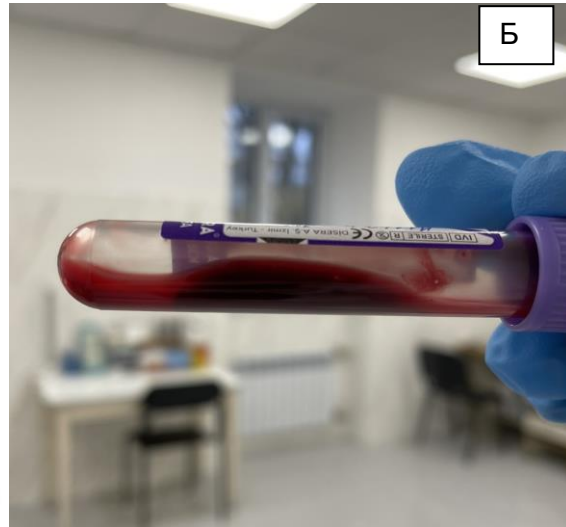


Рис. 1.5. Правила перемішування пробірок (А). Згусток крові у пробірці – дефект узяття біоматеріалу, його досліджувати неможливо (Б).

Правила призначення термінових досліджень

Для лабораторного дослідження в межах однієї лікарні клініцист має визначити пріоритет тестів. При визначенні тестів як «термінові» у бланку направлення ставиться позначка у графі «Cito». **Термінові лабораторні дослідження** можуть бути призначені виключно пацієнтам, що знаходяться у критичному стані та/або для негайного визначення/зміни лікувальної тактики.

Для тестів із позначкою «Cito!» час виконання дослідження від моменту узяття біоматеріалу не повинен перевищувати 60 хвилин, враховуючи доставку із клінічного відділення, процес пробопідготовки і технічного виконання.

Тести із позначкою «Cito!» підлягають негайному виконанню в КДЛ, незважаючи на переривання процесу планових досліджень, що проводяться у цей час і матеріальних втрат, якими це супроводжується. Клініцист, що замовив тест із позначкою у графі «Cito», організовує та контролює негайну доставку біоматеріалу до лабораторії.

Вкрай важливим елементом взаємодії клініциста та лабораторії є запит (правильних) тестів, вірно зібраний біологічний матеріал, обговорення спектру досліджень. При цьому клініцист **надає за запитом персоналу лабораторії необхідну інформацію про пацієнта**.

При зверненні у лабораторію клініцист оформлює бланк замовлення, визначає матеріал, який буде досліджуватися, та перелік тестів. Політикою медичного закладу може бути визначені рекомендовані (стандартизовані) «пакети» медичних послуг, які визначені для комплексного обстеження хворого із попереднім діагнозом клініки. Як правило, такі рекомендації надаються із принципу мінімальної, але достатньої інформативності дослідження. Лікар може орієнтуватися на ці рекомендації або визначати комплекс тестів на власний розсуд. При цьому **клініцист несе повну відповідальність за доцільність, своєчасність та очікувану інформативність кожного призначення** і повинен обґрунтувати цей перелік експертній комісії-при необхідності.

У додаткових матеріалах надані: приклад бланку направлення на дослідження та розроблені рекомендації для діагностики невідкладних станів у скринінговому режимі в Університетській клініці НМУ імені О.О. Богомольця, які студенти можуть використовувати для набуття практичних навиків, що передбачені при вивченні дисципліни «Лабораторна діагностика».



Міністерство охорони здоров'я України
Університетська клініка
 Національного медичного університету
 імені О.О. Богомольця
КЛІНІКО-ДІАГНОСТИЧНА ЛАБОРАТОРІЯ
 м. Київ, вул. Володимирів Винниченка, 9, 02000
 тел.: +38 (096) 256 21 62; +38 (066) 607 21 64
 ел. пошта: laboratoriuvuc@gmail.com

[illegible]

Коагулограма

- ☐ Загальний білок
- ☐ Альбумін
- ☐ Холестерин загальний
- ☐ Тригліцериди
- ☐ Холестерин ЛПВЩ
- ☐ Холестерин ЛПНЩ
- ☐ Індекс атерогенності
- ☐ Білірубін загальний
- ☐ Білірубін прямий
- ☐ Білірубін непрямий
- ☐ Калій
- ☐ Натрій
- ☐ Кальцій іонізуючий
- ☐ Кальцій загальний
- ☐ Сечовина
- ☐ Креатинін
- ☐ Сечова кислота
- ☐ АлАТ
- ☐ АсАТ
- ☐ ГГТ
- ☐ Лужна фосфатаза
- ☐ Альфа-амілаза
- ☐ С-реактивний білок
- ☐ Антистрептолізин-О
- ☐ Ревматоїдний фактор
- ☐ Глюкоза
- ☐ Тест «Постспрандіальна глюкоза»

- ☐ АЧТЧ
 - ☐ Протромбіновий час
 - ☐ Протромбіновий індекс
 - ☐ Тромбіновий час
 - ☐ Фібриноген
 - ☐ МНВ
-
- ☐ Час згортання цільної крові

- ☐ Гемограма
- ☐ Морфологічний опис клітин
- ☐ Група крові та резус-фактор
- ☐ RW - експрес

- ☐ Загальний аналіз сечі
- ☐ Аналіз сечі за Нечипоренком
- ☐ Діастаза сечі (альфа-амілаза)

- ☐ Копрограма
- ☐ Аналіз калу на наявність яєць гельмінтів
- ☐ Аналіз калу на приховану кров
- ☐ Аналіз зіскрібка на яйця гостриків (ентеробіоз)

- ☐ ПЛР тест на COVID-19

Інше _____

ПІБ медсетри _____
(підпис)

Додаток 2

Перелік тестів у вигляді «пакетів медичних послуг»,
для виконання в клініко-діагностичній лабораторії
Університетської клініки НМУ імені О.О. Богомольця
для пацієнтів швидкої допомоги та при госпіталізації
(Додаток №14 до наказу від 08.07.2021 № 427)

Код пакету	Код дослідження	Вид дослідження
Пакет №1 "При наданні швидкої допомоги"		
1017	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі,
	718	Глюкоза крові,
	Швидкі тести (за призначенням лікаря приймального відділення): на вагітність/ тропонін/ ВІЛ/ вірусний гепатит/ АГ COVID 19.	
	795	Швидкий тест на COVID-19
	796	Швидкий тест на ВІЛ
	110	Швидкий тест на гепатит
	109	Швидкий тест на тропонін
	797	Швидкий тест на вагітність
Пакет №2 "При госпіталізації в стаціонарне відділення"		
1018	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі
	718	Глюкоза крові
	716	Загальний холестерин
	Швидкі тести (за призначенням лікаря приймального відділення): на вагітність/ тропонін/ ВІЛ/ вірусний гепатит/ АГ COVID 19.	
	795	Швидкий тест на COVID-19
	796	Швидкий тест на ВІЛ
	110	Швидкий тест на гепатит
	109	Швидкий тест на тропонін
	797	Швидкий тест на вагітність
Пакет №3 "При госпіталізації терапевтичного відділення згідно попереднього діагнозу"		
Гіпертонічна хвороба:		
1019	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі
	718	Глюкоза крові
	716	Загальний холестерин
	712	Визначення креатиніну в сироватці крові за методикою кольорової реакції Яффе

	714	Визначення сечової кислоти у сироватці крові
Запальні захворювання міокарду, перикарду:		
1020	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі
	718	Глюкоза крові
	708	Визначення С-реактивного білка кількісним методом
	720	Визначення активності анти-О-стрептолізину у сироватці крові
	725	Визначення ревматоїдного фактора у сироватці крові
Панкреатит:		
1021	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі
	718	Глюкоза крові
	127	Діастаза сечі (альфа-амілаза)
	744	Визначення активності альфа-амілази у сироватці крові
	149	Мікроскопічне дослідження трьох препаратів (копрограма)
	150	Знаходження яєць гельмінтів (метод нативного мазку)
	151	Знаходження крові у фекаліях з допомогою бензидину та ін.
Холестистит:		
1022	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі
	718	Глюкоза крові
	710	Визначення білірубину та його фракцій в сироватці крові (метод Єндрашика)
	735	Визначення активності аланінамінотрансферази у сироватці крові
	736	Визначення активності аспартатамінотрансферази у сироватці крові
	737	Визначення активності гама-глутамілтрансферази у сироватці крові
	738	Визначення активності лужної фосфатази у сироватці крові
Гепатит, цироз:		
1023	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі
	718	Глюкоза крові
	710	Визначення білірубину та його фракцій в сироватці крові (метод Єндрашика)
	735	Визначення активності аланінамінотрансферази у сироватці крові
	736	Визначення активності аспартатамінотрансферази у сироватці крові
	737	Визначення активності гама-глутамілтрансферази у сироватці крові
	738	Визначення активності лужної фосфатази у сироватці крові
	709	Визначення загального білку сироватки крові по біуретовій реакції
Цукровий діабет:		
1024	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі
	718	Глюкоза крові

	730	Визначення кількості глюкози в сечі глюкозооксидазним чи ін. методом
	712	Визначення креатиніну в сироватці крові за методикою кольорової реакції Яффе
Ревматологічні захворювання суглобів:		
1025	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі
	718	Глюкоза крові
	708	Визначення С-реактивного білка кількісним ІФА методом
	720	Визначення активності анти-О-стрептолізину у сироватці крові
	725	Визначення ревматоїдного фактора у сироватці крові
	712	Визначення креатиніну в сироватці крові за методикою кольорової реакції Яффе
	714	Визначення сечової кислоти у сироватці крові
Виразкова хвороба:		
1026	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі
	718	Глюкоза крові
	151	Знаходження крові у фекаліях з допомогою бензидину та ін.
ХОЗЛ та Бронхіальна астма:		
1027	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі
	718	Глюкоза крові
	139	Цитологічне дослідження мокротиння фарбованих препаратів
	140	Мікроскопія нефарбованих препаратів (мокротиння)
	141	Дослідження на мікобактерії туберкульозу (ліквор і мокротиння)
Захворювання нирок:		
1028	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі
	718	Глюкоза крові
	132	Мікроскопічне дослідження осаду сечі при патології (білок в сечі, наявність патологічних елементів осаду сечі)
	712	Визначення креатиніну в сироватці крові за методикою кольорової реакції Яффе
	714	Визначення сечової кислоти у сироватці крові

Пакет №4 "При наданні швидкої допомоги та госпіталізації в неврологічне відділення"

1029	748	Загальний аналіз крові
	750	Загальний аналіз сечі
	718	Глюкоза крові
	707	Визначення протромбінового індексу та протромбінового часу
	115	Серодіагностика сифілісу - реакція мікропреципітації

ТЕМА 2

ВАЖЛИВІСТЬ ДОТРИМАННЯ ПРАВИЛ ПРЕАНАЛІТИЧНОГО ЕТАПУ ЛАБОРАТОРНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

За даними різних авторів, основним результатом хибних лабораторних тестів є помилки преаналітичного етапу, кількість яких визначається від 31,6% до 75%. (рис. 2.1)



Рис. 2.1 Доля помилкових результатів лабораторного дослідження в залежності від порушень правил на кожній фазі (Julie, 2012).

До порушень преаналітичного етапу відносять:

- ✓ необґрунтований запит на тестування,
- ✓ непідготовлений пацієнт,
- ✓ помилки оформлення замовлення,
- ✓ невірна ідентифікація пацієнта,
- ✓ невідповідна пробірка (контейнер),
- ✓ порушення збору проб та транспортування,
- ✓ не витримування співвідношення обсягу зразка/антикоагулянту,
- ✓ недостатній обсяг зразку,
- ✓ помилки маркування,
- ✓ сортування,
- ✓ маршрутизації тощо.

Оскільки, відповідальність за вибір тесту, підготовку пацієнта та організацію процедури узяття матеріалу несе повну відповідальність лікар, який призначив дослідження, то практично усі перераховані кроки преаналітичного етапу і є **зоною відповідальності клініциста**.

При **плановому** призначенні лабораторного тесту пацієнту рекомендовано: напередодні дослідження прийняти легку вечерю, уникаючи жирної та смаженої їжі, прийому алкоголю та куріння. Якщо планується визначення рівня глюкози крові – пацієнт вранці приходить натщесерце. Звісно, вживання води не обмежується.

Якщо для пацієнта повний голод викликає стресову ситуацію, й аналіз не передбачає визначення рівня глюкози, вранці можна припустити легкий сніданок у вигляді чашки чаю зі шматочком хліба (сухарика). Варто розуміти, що напередодні відвідування лабораторії, у більшості пацієнтів виникає хвилювання, занепокоєння, неспання, тому **треба мінімізувати стресове навантаження**. Лікар має пояснити пацієнту логіку дослідження, заспокоїти і підбадьорити. **Рекомендувати проводити планові аналізи на тлі звичайного режиму, ритму та способу життя.**

Кров – є найпоширенішим об'єктом дослідження в лабораторії. Однією із головних властивостей крові є реактивність – здатність реагувати на зміни в організмі зміною кількісного та якісного складу. Кров та її похідні використовують як основний матеріал **гематологічних досліджень, клінічної біохімії та коагулограми**.

Умови узяття матеріалу для клінічного аналізу крові

Найбільш популярними дослідженнями в КДЛ є виконання **клінічного аналізу крові**, який включає дослідження кількості клітинних популяцій (лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів), їх субпопуляцій, властивостей та морфологічних особливостей.

Традиційно для підрахунку кількості клітин використовують гематологічний аналізатор, з якого отримують протокол - гемограму. Поряд з цим, краплю крові фіксують на скельці, фарбують для візуального аналізу морфологічних особливостей клітин під мікроскопом (рис.2.2).

Матеріалом є цільна кров.

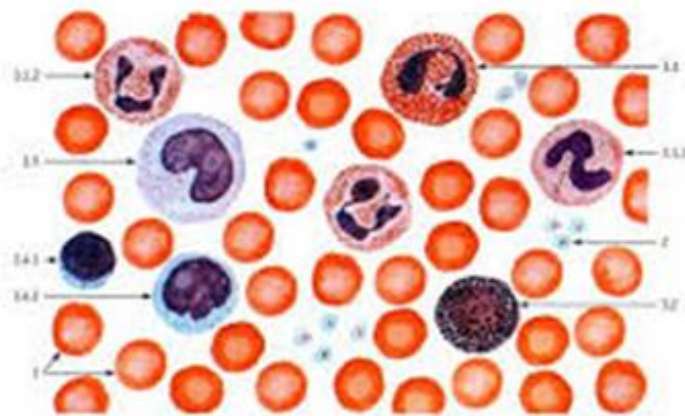


Рис. 2.2. Схематичне зображення мазку крові людини

Головна умова такого підходу - відсутність клітинних аглютинацій (склеювання клітин), хоча природна властивість клітин, при пошкодженні судини (проколі голкою вени), миттєво відтворювати тромб для запобігання крововтрати. Тому, для цього дослідження важливим є збір крові трьох компонентною системою з вакуумною пробіркою і сухим антикоагулянтом (ЕДТА із калієм- K2/K3), який попередньо нанесений на стінки пробірки (рис.2.3). В лабораторії такі пробірки маркіровані фіолетовими кришками.



Рис. 2.3. Вакуумні пробірки і сухим антикоагулянтом (ЕДТА із калієм- K3).

При правильному використанні вакуумної системи, у пробірку набирається певна кількість крові, розрахована на кількість антикоагулянта. Після вилучення пробірки з голкотримача, її необхідно акуратно перевернути 8-10 разів, для ретельного перемішування із антикоагулянтом, який зафіксований на стінках при виробництві пробірки. Категорично забороняється струшувати пробірку із кров'ю, оскільки мембрана еритроцитів легко порушується (виникає механічний гемолиз). У результаті кількість еритроцитів знижується, а гемоглобін, який вийшов із клітин у плазму заважає подальшому вимірюванню аналітів і робить пробу непридатною.

Яка різниця між плазмою і сироваткою крові

На перший погляд це схожі речовини, які утворюються із цільної крові, з якої прибрали формені елементи (рис.2.4). Однак, між ними є суттєва різниця, яка обумовлює причини того, що не можна порівнювати і моніторувати вміст речовин у пацієнта, що виміряні в плазмі та сироватці, оскільки може бути розбіжність.

Процес отримання сироватки дуже простий, тому вона є найбільш поширеним матеріалом дослідження. Якщо венозну кров помістити у чисту суху пробірку (скляну або пластикову), то через 15-20 хвилин в пробірці відтворяться міцні фібринові нитки, які заберуть як у сітку формені елементи і сформується **згусток крові**. Уся решта речовина – це **сироватка**. Відібрати її дуже легко, без загрози зачепити клітини. Збільшити її об'єм можна додатковим центрифугуванням згустку.

Досліджувати в складі сироватки можна усі речовини, які є в крові. Найбільш поширеним є визначення в сироватці біохімічних речовин, гормонів, регуляторних протеїнів, активних біологічних молекул, інтерлейкінів, окомаркерів, імуноглобулінів, антитіл і т.п.

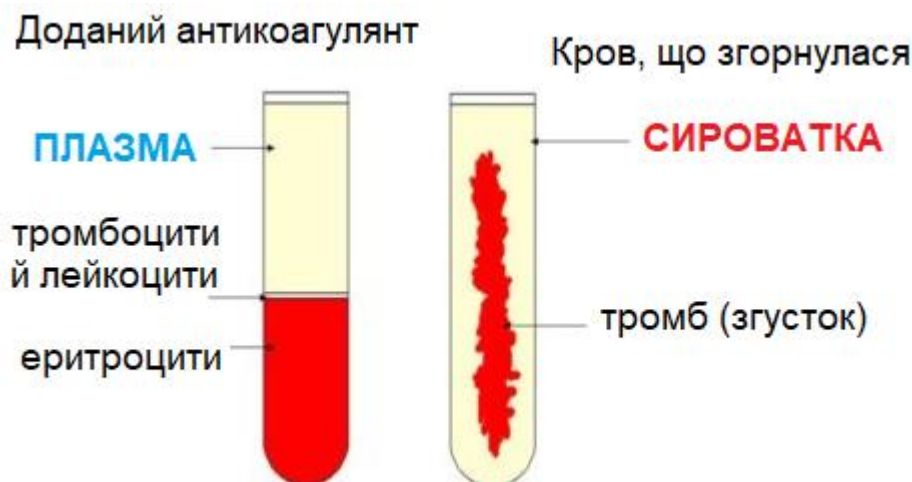


Рис. 2.4. Схема утворення плазми та сироватки із крові у пробірці.

Процес отримання плазми потребує певних зусиль і дотримання умов. **Плазма** – рідинний компонент крові, в якому відсутні формені елементи, але зберігаються усі фактори згортання. Традиційно, плазму збирають для дослідження системи гемостазу, тому, головна умова - зберегти властивості та вихідну кількість неактивних коагуляційних факторів. Для цього при узятті венозної крові джгут накладають не триваліше ніж на 30 секунд, щоб не активувати тріаду Вірхова, яка ініціює внутрішньо судинне утворення тромбу. Кров збирають вакуумною системою у спеціальні пробірки із блакитною кришкою, які вміщують рідкий антикоагулянт - цитрат натрію (рис.2.5).

Змішування його з кров'ю (ротація пробірки 3-4 рази) призводить до з'єднання цитрату із кальцієм - важливим елементом формування нерозчинного фібрину через утворення цитрату кальцію, що гальмує, на деякий час, активне природне формування згустку. В результаті в пробірці кров не згортається і зберігаються усі компоненти, які важливі для дослідження гемостазу.



Рис. 2.5. Вакуумні пробірки і цитратом натрію для отримання плазми

При вертикальному відстоюванні, формується 3 шари: верхній – бідна тромбоцитами плазма, середній (маленький прошарок) – концентрація клітин (лейкоцитів та тромбоцитів), нижній – осад із еритроцитів. Для отримання плазми, як правило, пробірку додатково центрифугують і акуратно відбирають плазму.

В плазмі також як і в сироватці можна визначати абсолютно усі речовини, які є в цільній крові. Але порівнювати отримані дані не рекомендовано, оскільки деякі аналіти, або їх складові приймають участь в тромбоутворенні, тому виникає різниця між вмістом їх в сироватці та плазмі.

Основні причини відхилення матеріалу для дослідження в лабораторії

Нехтування правилами обов'язкової, але акуратної ротації пробірки із антикоагулянтом дуже часто призводить або до утворення згустку, або до механічного гемолізу клітин.

На етапі прийому біоматеріалу фахівець лабораторії визначає ці дефекти візуально оглядаючи пробірку. Якщо вказані явища визначені наочно, матеріал у роботу не приймається, це фіксується в *журналі дефектури* і про відсутність дослідження інформується лікар, який направив цей матеріал.

Однак, часто буває, що візуально проба не виглядає дефектною, але під час центрифугування виявляються наслідки **гемолізу** клітин у вигляді червоного фарбування біоматеріалу (сироватки/плазми) (рис.2.6)



Рис. 2.6. Різні ступені гемолізу плазми крові (три пробірки праворуч)

Практично усі лабораторні методи аналізу ґрунтуються на спектрометрії, або визначенні оптичної щільності продукту – біоматеріалу, якій вступив у реакцію із реагентом. Додаткове фарбування біоматеріалу молекулами гему (із порушених еритроцитів) робить його не придатним для дослідження.

Аналогічним чином, похибку вимірювання вносить опалесценція біоматеріалу, яка виникає через велику кількість мікрочастинок жиру, якщо пацієнт має порушення ліпідного обміну, або перевантаження жирної їжі напередодні узяття матеріалу. Ці зміни сироватки (плазми) називають «молочна» чи **хільозна** і також відбраковують.

Для підрахунку клітин і відокремлення популяцій за розміром (як це відбувається в геманалізаторі) вкрай важливим є збереження клітин та їх відокремленість. Недостатнє перемішування крові із антикоагулянтом призводить до **утворення мікрозгустків** із тромбоцитів, які апарат сприймає за інші клітини, які крупніше за розміром. І демонструє зменшену кількість тромбоцитів – хибну тромбоцитопенію, і підвищену кількість інших клітин (як правило лейкоцитів), що суттєво викривлює дані протоколу.

Особливості біоматеріалу для інших видів досліджень

Для досліджень **імуногематології**, визначення групи крові та резус-фактору, а також для онкогематологічних досліджень використовують свіжу венозну або капілярну кров. Для діагностики лейкозів, готують препарати із крові з антикоагулянтом, які специфічно з'єднують флуоресцентну мітку з рецептором на поверхні клітини (для цього використовують такі поверхневі маркери, як CD3, CD4, CD8, CD 19, CD 20, CD22 і т.д.). Методом проточної цитофлуориметрії проводять сортування клітин, за типом рецепторів і визначають моноклони для оцінки імунного статусу пацієнта, оцінку імунологічного фенотипу нормальних та пухлинних клітин для своєчасної постановки діагнозу, а також моніторингування гострих лейкозів під час лікування.

Для встановлення діагнозу в онкогематології обов'язковим є дослідження кісткового мозку – мієлограма. Виконується в специфічних центрах високо кваліфікованим лікарем-лаборантом. Результат обговорюється із лікарем-гематологом, який спостерігає пацієнта.

Загальноклінічні методи дослідження доволі розповсюджені в лабораторіях, оскільки не потребують специфічного обладнання і основним підходом є мікроскопія препаратів і проведення фізико-хімічних досліджень сечі, калу, виділень із статевих органів, еякуляту, харкотиння, жовчі для діагностики гострих та хронічних захворювань відповідних органів та систем організму. Практично весь біоматеріал збирається неінвазивно. Для цього визначені певні рекомендації (додаток 1), які клініцист має озвучити пацієнту і пояснити йому цінність та інформативність аналізу.

Метою проведення **цитологічного дослідження ексfolіативного (секретів, екскретів, харкотиння, ексудатів, трансудатів, зіскобів із поверхні ран, виразок) та пункційного матеріалу** є диференційна діагностика запальних, передпухлинних та пухлинних процесів. Важливим є дослідження зіскобів, отриманих із шийки матки і цитологічне дослідження пункційного матеріалу, отриманого з пухлин, пухлиноподібних утворень та ущільнень різної локалізації (голови, шиї, лімфатичних вузлів, молочної залози, щитоподібної залози тощо). Як правило, узяття біоматеріалу відбувається інтраопераційно, і особливості правил преаналітичного етапу хірург має з'ясувати із лікарем-лаборантом цитологічного відділу.

Мета **мікробіологічних (вірусологічних)** досліджень є ідентифікацію умовно-патогенних мікроорганізмів з використанням культуральних, серологічних та молекулярно-генетичних методів лабораторної діагностики і визначення чутливості мікроорганізмів до антимікробних засобів, а також визначення механізмів резистентності. Ці дослідження є високотехнологічними, потребують спеціальної інфраструктури та обладнання. Матеріал для дослідження (потенційно заражена середовище) збирається згідно рекомендацій у стерильні одноразові контейнери. Важливо пам'ятати, що при відборі матеріалу для різних досліджень, перша порція зіскобів направляється на мікробіологічні дослідження.

Для дослідження методом полімеразно-ланцюгової реакції, верифікації ДНК/РНК важливим є узяття матеріалу якій містить ядерні клітини, але позбавлений від слизу, крові, оскільки ці речовини гальмують ПЛР.

Лабораторна імунологія досліджує особливості імунного статусу пацієнта, які визначають шляхом проточної цитофлуориметрії. Також характер імунної відповіді досліджують за кількість імуноглобулінів сироватки, плазми, слини тощо, які вимірюють методами ІФА, ІХЛА.

Метою **лабораторної генетики** є пренатальна лабораторна діагностика спадкових хвороб та проведення молекулярно-генетичних досліджень з метою діагностики спадкової патології з використанням сучасних методів (флуоресцентна гібридизація *in situ*, ПЛР, порівняльна геномна гібридизація, секвенування тощо). Для цих досліджень беруть ядерні клітини пацієнта, для того, щоб провести виділення із них матеріалу ДНК/РНК. Як правило, це клітини крові – лейкоцити, або букальний зішкріб. При дослідженні матеріалу плоду для перинатального аналізу беруть матеріал із крові матері, або амніотичну рідину.

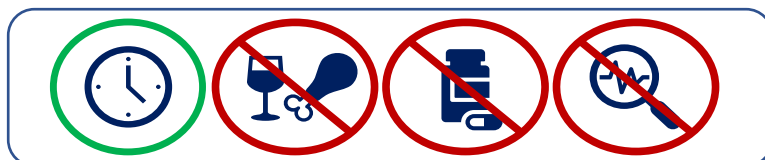
РЕКОМЕНДАЦІЇ

для лікарів та середнього медичного персоналу

з підготовки пацієнта до проведення лабораторних досліджень, узяття, зберігання та доставки біологічного матеріалу в лабораторію

При плановому призначенні лабораторного тесту пацієнту рекомендовано здавати матеріал для аналізу з 8 до 11 ранку, напередодні прийняти легку вечерю, уникаючи жирної та смаженої їжі, прийому алкоголю та куріння.

Категорично не рекомендується проводити дослідження крові пацієнтам після рентгенівських, ультразвукових досліджень, сеансу барокамери, фізіопроцедур тощо. Після вищезгаданого результати аналізу будуть обов'язково спотворені. Недоцільно брати кров для дослідження одночасно із проведенням пацієнта інфузійної терапії. Якщо цього неможна запобігти – то треба обов'язково це визначити у направленні.



В замовленні у лабораторію лікар обов'язково має вказати

- Прізвище, ім'я
- вік
- стать
- діагноз пацієнта
- лікарські препарати, які він приймає пацієнт,
- свої дані для контакту.

Для консультативних питань щодо особливостей преаналітичного етапу лікар може звернутися до співробітника лабораторії за допомогою та відповідним роз'ясненням.

УЗЯТТЯ ВЕНОЗНОЇ КРОВІ ДЛЯ АНАЛІЗУ

ВИКОРИСТАННЯ ВАКУУМНИХ ПРОБІРОК ЗАБЕЗПЕЧУЄ ПРАВИЛЬНУ ПРОЦЕДУРУ ЗБОРУ ЗРАЗКА, ТРАНСПОРТУВАННЯ І ЯКІСНИЙ АНАЛІЗ.

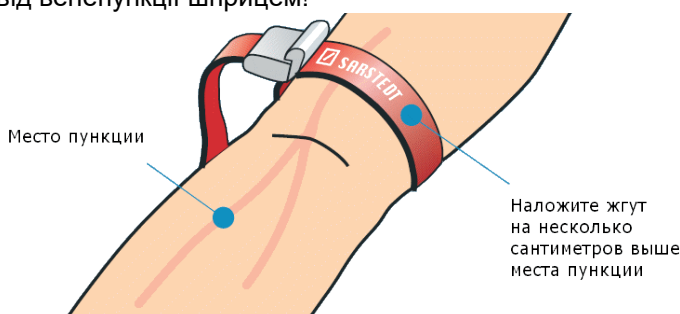


Трьохкомпонентна система для забору венозної крові складається з:

1. Стерильної вакуумної пробірки з консервантом;
2. Двосторонньої голки для внутрішньовенної ін'єкції;
3. Голкотримача

Техніка забору крові з вени **НЕ ВІДРІЗНЯЄТЬСЯ** від венепункції шприцем!

Продезинфікуйте місце венепункції марлевою серветкою.





- Візьміть голку і зніміть ковпачок з боку мембрани з гуми.
- Вставте голку в утримувач і закрутите до упору.
- Зніміть захисний ковпачок з іншого боку.
- Введіть вакуумну систему «тримач-голка» в вену відповідно до алгоритму звичайного взяття крові за допомогою шприца.
- Слідкуйте, щоб голка перебувала зрізом вгору під кутом 15° відносно поверхні шкіри.
- Оскільки другий кінець закритий мембраною, кров по голці не йде.



- Притримуйте голкотримач і вставте у нього пробірку до упору. В результаті проколеться мембрана і заглушка, формується канал між вакуумної колбою і веною, кров буде наповнювати пробірку. Голку не можна рухати, коли починає надходити кров. Процес триває поки не компенсується вакуум в пробірці.



- Як тільки кров почала поступати до пробірки одразу послабте джуг або його зніміть!
- Після зупинки надходження крові пробірку вийміть із тримача.
- Якщо потрібно – вставте в нього іншу пробірку.
- Відразу ж після заповнення пробірку акуратно переверніть декілька разів для змішування проби з наповнювачем:



- Після заповнення пробірки від'єднайте її від тримача і вийміть систему «тримач-голка» з вени.
- На місце пункції прикладіть стерильну серветку/ватну кульку, змочену антисептиком, або наклейте бактерицидний пластр.
- Пробірки маркіруйте і помістіть в спеціальний контейнер для транспортування в лабораторію
- Використану голку закрийте, відкрутіть від голкотримача та помістіть в контейнер із дез-розчином.



Кожний голкотримач можна використовувати для 3-4 пацієнтів.

АНАЛІЗ СЕЧІ

Для проведення **ЗАГАЛЬНОКЛІНІЧНОГО аналізу сечі** необхідно досліджувати 100-150 мл свіжої ранкової сечі.

1. Сечу збирають вранці натще відразу після сну в сухий чистий посуд.
2. Перед збиранням сечі проводять ретельний туалет зовнішніх статевих органів.
3. З катетера можна збирати лише свіжу сечу. **І з тривалого катетера сечу для дослідження збирати НЕ МОЖНА.**
4. Зібрану порцію якнайшвидше доставляють до лабораторії.



ДОСЛІДЖЕННЯ ДОБОВОЇ СЕЧІ

Для цього аналізу необхідно досліджувати невелику порцію (100-150 мл) (частина добової сечі), але **обов'язково необхідно знати весь обсяг сечі пацієнта за добу.**

1. Для дослідження пацієнт повинен зібрати всю сечу протягом однієї доби (24 години), перебуваючи на звичайному для нього питному режимі (До 1,5-2 л рідини на добу).
2. Вранці пацієнт звільняє сечовий міхур, потім протягом доби збирає всю сечу в чисту широкогорлу ємність із кришкою, що щільно закривається. Ця ємність повинна мати об'єм не менше 2 л і зберігатись під час збору в прохолодному місці.
3. Після закінчення однієї доби пацієнт вимірює мірною колбою всю кількість добової сечі і записує результат.
4. Із загального обсягу потрібно **відлити 100-150 мл** та доставити до лабораторії. При реєстрації аналізу у лабораторії **обов'язково потрібно називати повний обсяг добової сечі.**

АНАЛІЗ СЕЧІ ЗА МЕТОДОМ НЕЧИПОРЕНКА

Для цього аналізу до лабораторії доставляється середня порція ранкового сечовипускання. Тому весь обсяг ранкової сечі умовно ділитися на 3 частини, середня з яких підлягає аналізу.



Зверніть увагу! Якщо вранці збирається сеча для аналізу за Нечипоренком, то збирання сечі на загальноклінічний аналіз (див. вище) **проводиться в інший день!**

АНАЛІЗ СЕЧІ ЗА МЕТОДОМ ЗИМНИЦЬКОГО

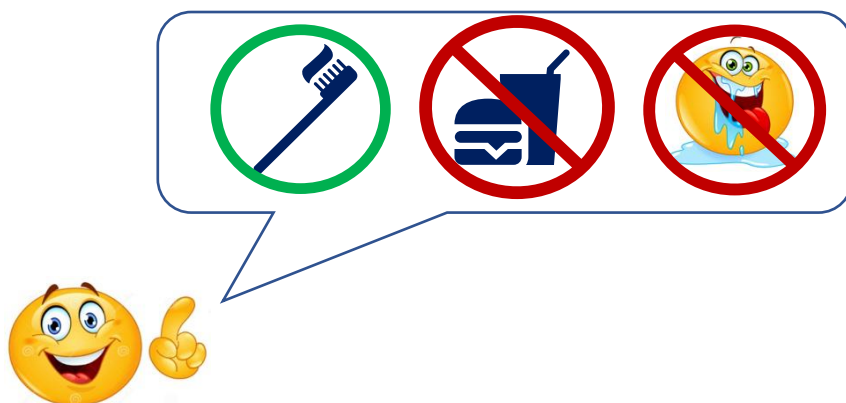
Для цього аналізу збирають 8 порцій сечі протягом доби. Дослідження проводиться при звичайному питному режимі та харчуванні хворого, але кількість рідини, що вживається на добу, не повинна перевищувати 1,0-1,5 літра.

1. Для дослідження готується 8 чистих прозорих ємностей. **На кожній посудині відзначається номер порції та час її збирання (9:00, 12:00, 15:00 і т.д.).**
2. О 6:00 годині ранку пацієнт спорожняє сечовий міхур, і ця порція не враховується.
3. Починаючи з 9:00 години ранку, точно кожні 3 години, збирають порцію сечі в окрему марковану ємність (до 6 години ранку наступного дня вийде 8 порцій).
4. Для цього дослідження **всі порції** доставляють до лабораторії, де вимірюється кількість та відносна густина кожної порції.

АНАЛІЗ МОКРОТИННЯ

Мокротиння для аналізу збирають одноразово у чистий сухий широкогорлий посуд **шляхом відкашлювання**.

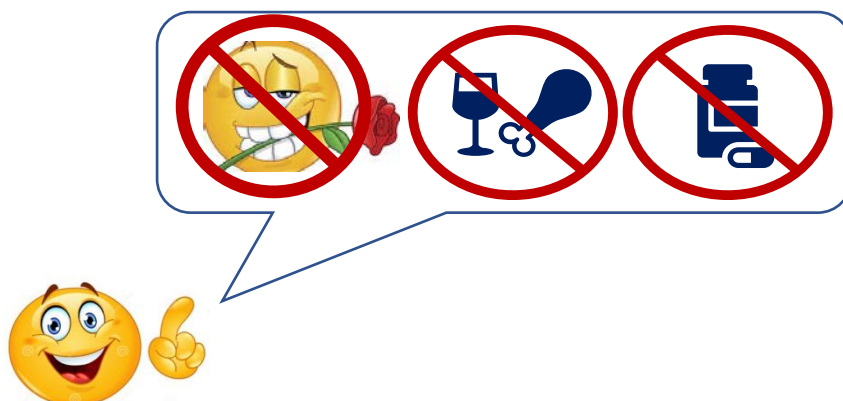
1. Для дослідження використовується ранкова порція, взята до їди.
2. Пацієнт попередньо повинен вичистити зуби без зубної пасти, прополоскати рот і глотку кип'яченою водою.
3. Слід уникати попадання слини і секрету носоглотки в зразок мокротиння, що отримується.
4. Після збору матеріалу зразок **відразу (до 20-30 хв)** доставляється в лабораторію.



ДОСЛІДЖЕННЯ ЄЯКУЛЯТУ

Для дослідження еякулят (сперма) збирається в стерильний посуд під час природної еякуляції.

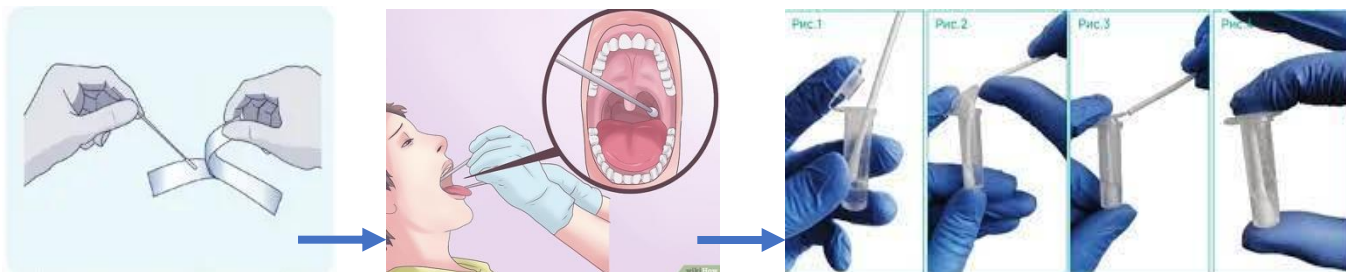
1. Збір сперми рекомендовано проводити не менше, ніж після 3-5 денної статевго стримання.
2. У цей час виключається вживання алкоголю, прийом лікарських засобів.
3. Збір сперми проводиться безпосередньо перед дослідженням або доставляється в лабораторію протягом 30 хв теплomu середовищі (30-35 °C).



ДОСЛІДЖЕННЯ ЕПІТЕЛІАЛЬНІ ЗІШКРІБІВ ЗІ СЛИЗОВИХ ОБОЛОНОК ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ІНФЕКЦІЙНОГО АГЕНТА МЕТОДОМ ПЛР:

Взяття матеріалу проводиться в умовах **процедурного кабінету відповідного профілю**. Після отримання матеріалу необхідно якнайшвидше доставити проби в лабораторію.

Взяття зразків необхідно проводити стерильним інструментарієм (одноразовим) в одноразовий стерильний посуд. Для цього використовують спеціальний одноразовий пластиковий зонд типу Cervex-brush (Voba-brush), що має вигляд йоржика та забезпечує отримання великої кількості клітинного матеріалу з досліджуваної ділянки, а також спеціальні пробірки-контейнери з консервантом.



- *зі слизової зів та дихальних шляхів* -злегка обертаючи йоржик, проводять їм 1-2 рази по слизовій оболонці в місцях передбачуваної локалізації інфекційного агента;
- *з кон'юнктиви* -відтягнувши край століття, кінчиком йоржика обережно проводять по слизовій оболонці в місцях передбачуваної локалізації інфекційного агента;
- *з уретри у чоловіків* -йоржик обережно вводять на глибину 4 см і здійснюють 1-2 обертальних руху, після чого йоржик витягають;
- *з уретри у жінок* -йоржик обережно вводять на глибину 1 см і здійснюють 1-2 обертальних руху, після чого йоржик витягають;
- *з цервікального каналу* -попередньо видаляють слиз за допомогою стерильного ватного тампона, потім вводять йоржик на глибину 0,5-1 см, здійснюють 1-2 обертальних руху, після чого йоржик витягають;

Після взяття матеріалу зонд опускають у пластикову пробірку, що містить 100 мкл стерильного розчину-консерванту, ретельно перемішують, залишки рідини на зонді віджимають стінки пробірки, зонд вилучають (викидають в контейнер з дезінфікуючим розчином), пробірку зачиняють кришкою.



ПРИ УЗЯТТІ МАТЕРІАЛУ НЕПРИПУСТИМЕ ПОТРАПЛЯННЯ СЛІДІВ КРОВІ ТА ВЕЛИКОЇ КІЛЬКОСТІ СЛИЗУ!

ЗБЕРІГАННЯ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

1. Зразки можуть зберігатися при кімнатній температурі не більше 2-х годин. При необхідності тривалішого зберігання проби можуть бути поміщені в холодильник з температурою 2-8 °С, не більше ніж на 1 добу. Більше тривале зберігання (до 2-х тижнів) допустимо в замороженому вигляді в морозильній камері при температурі мінус 20 °С. Не допускається повторне заморожування-відтаювання проб.
2. Допускається зберігання взятої крові за температури 4 °С протягом 24 годин (не заморожувати!). У разі необхідності тривалого зберігання (для більшості досліджень) кров центрифугують, та розділяють на плазму і клітини, які необхідно відокремити у різні пробірки і зберігати при температурі мінус 16-20 °С не більше 2 тижнів.
3. Транспортування проб повинно здійснюватися у термосах або термоконтейнерах з дотриманням правил зберігання зразків та правил транспортування інфекційних матеріалів.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ПАЦІЄНТА ДО ДОСЛІДЖЕННЯ:

- Мазок з *кон'юнктиви ока* проводиться вранці до вмивання.
- Зішкріб епітеліальних клітин з *уретри* проводиться вранці до першого сечовипускання, і пацієнту рекомендується не мочитися протягом 5-6 годин до взяття проби. Оскільки **екскреторні компоненти сечі, проходячи через сечівник створюють агресивне середовище і вимивають частину поверхневого епітелію, можливо містить збудник.**
- Зішкріб епітеліальних клітин з *цервікального каналу та піхви* повинен бути взятий до мануального дослідження гінекологом. Не можна брати матеріал під час менструації. **Перед узяттям матеріалу протягом 24 годин не слід проводити спринцювання, будь-яку інтравагінальну терапію та статевий акт.**
- Сечу для дослідження збирають вранці відразу після сну чи не раніше, ніж через 3-5 годин після останнього сечовипускання. До забору сечі проводять туалет зовнішніх статевих органів та збирають невелику першу порцію сечі в стерильний посуд.
- Слина для дослідження збирається шляхом випльовування у стерильну пробірку. Безпосередньо перед збором слини необхідно видалити зубні протези, що знімаються, почитити зуби без зубної пасти, добре прополоскати рот без використання будь-яких засобів. За 12 годин до взяття біоматеріалу виключається вживання їжі, алкоголю, лікарських препаратів.
- При збиранні *секрету передміхурової залози та сперми* необхідно протягом 3 попередньої доби виключити статеві контакти.
- *Лейкоцитарна маса* крові відділяється з цільної крові, яка береться вранці, натщесерце в пробірку з антикоагулянтом (5% цитратом натрію).
- Взяття зішкрібу епітеліальних клітин з *носоглотки* проводиться натще або не раніше, ніж через 2-4 години після їжі.

Біологічні середовища, у яких може бути виявлено збудник за умови його присутності в організмі. Доцільність аналізу біоматеріалу для виділення ДНК збудника визначає лікар-клініцист, оцінюючи клінічну картину, перебіг захворювання, епідеміологічне оточення, анамнез та ін. пацієнта.

<i>Хламідія трахоматис</i>	зішкріб клітин циліндричного епітелію із цервікального каналу, уретри, кон'юнктиви очей, задній стінці глотки, осад сечі, сперма, секрет простати, синовіальна рідина.
<i>Хламідія пневмонія</i>	слина, зішкріб із носоглотки.
<i>Мікоплазма гомініс</i>	зішкріб епітеліальних клітин з цервікального каналу, уретри, піхви, задньої стінки глотки, осад сечі, сперма, секрет простати.
<i>Мікоплазма геніталіс</i>	зішкріб епітеліальних клітин з цервікального каналу, уретри, піхви, задньої стінки глотки, осад сечі, сперма, секрет простати.
<i>Мікоплазма пневмонія</i>	зішкріб з носоглотки, промивні води бронхів.
<i>Хелікобактер пілори</i>	зішкріб епітелію із зубо-ясенної кишені, слина.
<i>Трихомонада вагіналіс</i>	зішкріб епітеліальних клітин з уретри, піхви.
<i>Гарднерелла</i>	зішкріб епітеліальних клітин з уретри, піхви.
<i>Уреаплазма</i>	зішкріб епітеліальних клітин з цервікального каналу, уретри, піхви, задньої стінки глотки, осад сечі, сперма, секрет простати.
<i>Токсоплазма</i>	у лейкоцитарній масі крові.
<i>Вірус простого герпесу 1/2 типів</i>	зішкріб епітеліальних клітин слизової оболонки піхви, цервікального каналу, уретри, слина, спинномозкова рідина, лейкоцитарна маса крові, зіскрібок з носоглотки
<i>Цитомегаловірус</i>	зішкріб епітеліальних клітин слизової оболонки піхви, цервікального каналу, уретри, слина, спинномозкова рідина, лейкоцитарна маса крові, зіскрібок з носоглотки.
<i>Вірус папіломи людини</i>	зішкріб епітеліальних клітин з цервікального каналу або уретри.

БАКТЕРІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріал для дослідження слід брати до початку антибактеріальної терапії чи інтервалах між курсами лікування **при дотриманні правил асептики**. При збиранні матеріалу тампони повинні бути трохи вологими, тому що при їх висиханні гине більшість бактерій.

Особливістю умов транспортування та зберігання матеріалу для бактеріологічного посіву є **дуже короткий термін зберігання**. При неможливості термінового транспортування біоматеріал зберігають у холодильнику трохи більше 2 годин .



<https://ukr.media/medicine/380242/>



Узяття ранового виділення проводить лікар

- Рекомендується проводити взяття рідких мас рани за допомогою шприца. За неможливості здійснення об'ємного методу допускається взяття стерильним ватним тампоном.
- Для цього шкіру навколо рани обробляють фізіологічним розчином і 70% етиловим спиртом (або іншим антисептиком) для видалення поверхневої мікрофлори, нанесених місцевих антисептичних і антибактеріальних препаратів. Потім стерильною серветкою видаляють гній, детрит та некротичні маси.
- Взяття біоматеріалу проводять круговими обертальними рухами від центру до периферії ранової поверхні. Матеріал беруть двома тампонами.
- При наявності в рані дренажів рідину відсмоктують шприцом і в кількості 1-2 мл і поміщають в стерильну пробірку. Шматочки тканин, промивну рідину з дренажу також беруть інші стерильні пробірки.

Узяття крові для посіву беруть шприцом з периферичної вени (обсяг у дорослих не менше 10-20мл, у дітей 5-10 мл) біля ліжка хворого чи у маніпуляційному кабінеті

- Шкіру над веною, обробляють тричі: 70% спиртом, потім 5% настоянкою йоду, потім знову спиртом.
- Процедуру взяття крові та її посів рекомендується виконувати двом співробітникам наступним чином: 1-й набирає кров із вени, 2-й – виконує посів у флакони.
- Для посіву над полум'ям спиртовки необхідно відкрити пробки флаконів, підставити флакони з середовищем під струмінь крові зі шприца, обпалити шийки та пробки флаконів і щільно їх закрити.
- Доставляють флакони до лабораторії у контейнерах у вертикальному положенні. Пробки у флаконах мають бути сухими!

Узяття матеріалу із піхви, шийки матки та цервікального каналу робить лікар акушер-гінеколог стерильним ватним тампоном або бактеріологічною петлею.

- Матеріал для посіву беруть до проведення мануального дослідження стерильним ватним тампоном з патологічно змінених ділянок слизової оболонки.
- Шийку матки обробляють стерильним фізрозчином (стерильною водою), не торкаючись стінок піхви, обережно вводять у цервікальний канал ватний тампон і беруть матеріал для досліджень.
- Для посіву можна використовувати зішкріб слизової оболонки, отриманий при діагностичному вишкрібанні стінок цервікального каналу .

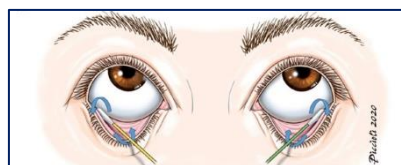
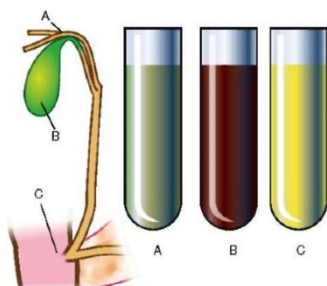
Узяття слизової верхніх дихальних шляхів - тампон вводять у порожнину рота, не торкаючись язика, знімають наліт і слиз з мигдаликів, м'якого піднебіння, язичка, задньої стінки глотки. За наявності плівки її знімають стерильним пінцетом.

Узяття жовчі - У нормі жовч стерильне середовище, тому її збирають у процедурному кабінеті при зондуванні в три стерильні пробірки (окремо порції а, в і с).

- Пробірки повинні знаходитись у строго вертикальному положенні.
- Під час операції взяття жовчі роблять шприцом в одну стерильну пробірку, дотримуючись усіх правил асептики.
- Отримані порції жовчі не зберігаються і доставляються до лабораторії не пізніше 1-2 годин від моменту взяття матеріалу.

Узяття матеріалу з очей робить лікар-окуліст, з уражених місць у розпал запального процесу

- За 5-6 годин до забору матеріалу скасовують прийом лікарських речовин та процедури.
- Кон'юнктиви очей беруть стерильними ватними тампонами з внутрішньої поверхні нижньої повіки плавним рухом до внутрішнього кута очної щілини.
- Не можна торкатися тампоном вій, для цього повіки потрібно притримувати руками.
- При взятті матеріалу з краю повік, скоринки гною видаляють пінцетом і беруть матеріал стерильним тампоном з зони біля вій.



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Procedure_of_conjunctival_swabs.jpg

Тема 3

Лабораторна гематологія.
Маркери оцінки запалення різної етіології.

Клінічний аналіз крові – найбільш популярне і розповсюджене дослідження. Принцип якого полягає у підрахунку кількості клітин периферичної крові: лейкоцитів (WBC white blood cells), еритроцитів (RBC — red blood cells), тромбоцитів (PLT — platelets), вимірювання гемоглобіну (HGB), розрахунку гематокриту (HCT), тромбокрити (PTC) та інших індексів.

Основною задачею, яку вирішує клініцист при інтерпретації результату клінічного аналізу крові є: оцінка наявності **бактеріального запалення**, наявності **анемії** та **крововтрати**.

В сучасних лабораторіях клінічний аналіз крові виконується за допомогою гематологічного аналізатора із відтворенням **гемограми** (протокол дослідження). Тривалість тесту – 60 секунд. Такий підхід визначає аналіз як скринінговий – що проводиться для значного контингенту із метою визначити відхилення, як глобальні ознаки патології. Далі, клініцист інтерпретує дані, співставляє із клінічною картиною і визначає подальші діагностичні або лікувальні кроки.

Сучасні гематологічні апарати відтворюють від 20 до 50 параметрів, які є корисними для аналізу. Вміння інтерпретувати усі параметри гемограми надають клініцисту багато цінної інформації про стан організму

Однак, не зважаючи на сучасні можливості лабораторної гематології, для діагностики бактеріального запалення доволі часто клініцисти використовують групу параметрів, які мають низьку інформативність для диференціальної діагностики запалення, **низьку чутливість та специфічність і вважаються застарілими: візуальний підрахунок різних типів лейкоцитів (лейкоформула), візуальне визначення частки паличкоядерних нейтрофілів, С-реактивний протеїн, швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ).**

Нажаль, ці параметри продовжують зберігати свою популярність при замовленні в лабораторії.

Згідно з сучасними уявленнями, аналіз розвитку бактеріального запалення варто проводити із урахуванням регуляторних молекул (цитокінів), які визначаються патогенетичними ланками, що активуються при пошкодженні тканин: прокальцитонін, IL-1-бета, IL-6, IL-8. При цьому, максимальна чутливість прокальцитоніну визначена до 70%. Враховуючи **кінетику вказаних речовин під час розвитку запалення** (рис.3.1), максимальну концентрацію в крові в перші 2-3 години попадання бактерії, а також витрати на їх дослідження, в лабораторіях України визначили ці параметри **не популярними**. Чутливість тесту СРБ для диференціювання вірусного та бактеріального запалення також визнана не високою (67-70%).

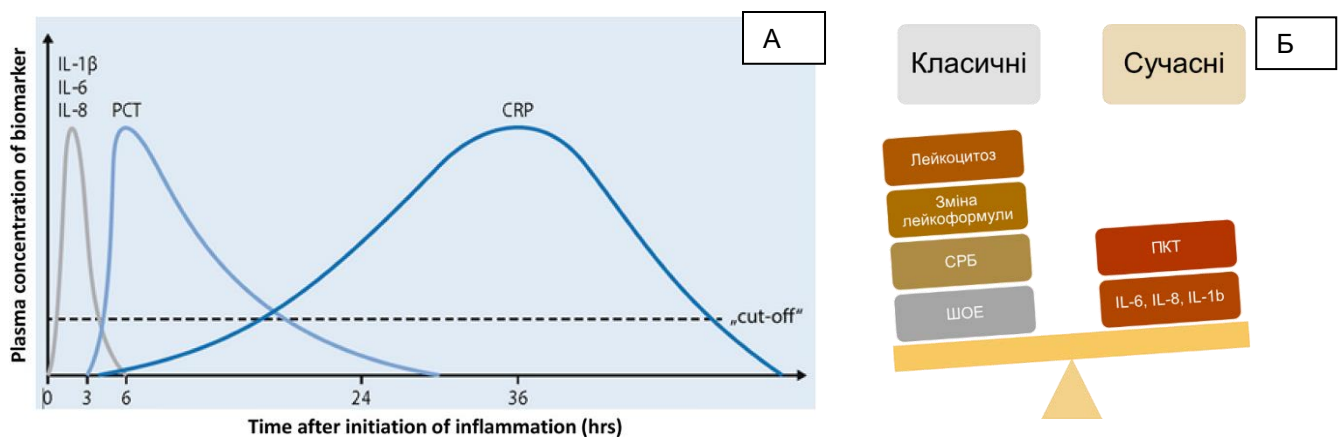


Рис. 3.1. Кінетика біохімічних маркерів запалення -А (TimNiehues, 2018) ПСТ- прокальцитонін . Популярність лабораторних тестів - Б

Враховуючи високу реактивність крові у відповідь на бактеріальне запалення, швидку зміну параметрів, особливо лейкоцитарних, при інтерпретації клінічного аналізу крові, рішення про наявність та стадію запального процесу приймає **клініцист**, перш за все, **ґрунтуючись на клінічній картині, скаргах, анамнезі хворого**, і лише – додатково - на оцінці ряду об'єктивних даних, в тому числі результатів лабораторного дослідження.

Лейкоцитоз, як параметр характеристики запалення

Лейкоцити у кровоносному руслі практично не активні. Вони виконують свою функцію захисту організму від бактерії не в судині, а після виходу у сполучну тканину. Але ж у лабораторії аналізують клітини венозної крові, які у цей момент перебували у судині.

За відсутності запалення, відбувається рівномірний вихід лейкоцитів із кісткового мозку і міграція їх у тканину. Кістковий мозок має суттєвий резерв гранулоцитарних лейкоцитів, який складає до 90% зрілих (сегментоядерних) клітин. У кровоносне русло виходить за фізіологічних умов лише 10% зрілих гранулоцитів (Рис. 3.2), переважна більшість яких – це нейтрофіли. Лейкоцити знаходяться в крові 3-4 години, а потім незворотно йдуть з неї і продовжують свою життєдіяльність у тканині близько 8-10 діб.

При виникненні запалення, або інших ситуацій (прийом їжі, вагітність, м'язова активність, стрес і т.п.), картина периферичної крові змінюється для формування адекватної відповіді на зсув гомеостазу.

У відповідь на попадання бактеріального антигену і виникнення

інфекційного вогнища доволі швидко (до 6 годин) виникає викид значного пулу нейтрофілів із кістковомозкового резерву. І це є єдиний механізм формування **лейкоцитозу** у кровоносному руслі - важливого кількісного параметру оцінки запального процесу.

Маргінальний (пристінковий) пул клітин зменшується, всі клітини у складі циркулюючого – завдяки хемотаксису прямують до вогнища запалення і попадають у тканину. Регуляторами цього процесу є хемокіни, інтерлейкіни, які виробляються макрофагами тканини, у відповідь на продукти діяльності бактерій (рис. 3.3). Важливим індуктором виходу клітин тканину є зниження рН середовища. Вважається, що пошкоджені антигеном (бактерією) мембрани клітин виділяють арахідонову кислоту та прозапальні цитокіни, що окислює середовище і є одним із факторів активації надходження лейкоцитів.

Кількість лейкоцитів – реактивний показник, пояснюється потребою організму на даний час, перебігом запального процесу, властивостями і агресією антигену. Динаміка лейкоцитарної реакції має хвилеподібний характер: початковий лейкоцитоз змінюється лейкопенією, а потім знову спостерігається швидке наростання лейкоцитозу.

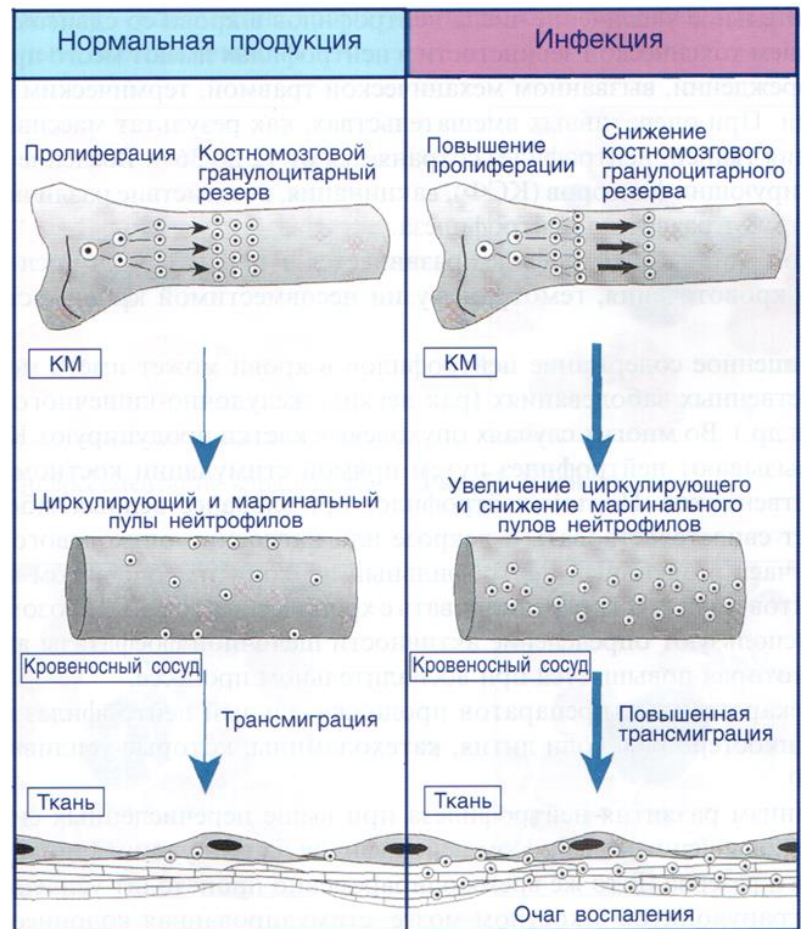


Рис. 3.2. Схема міграції гранулоцитів за різних умов (Луговська, 2006)

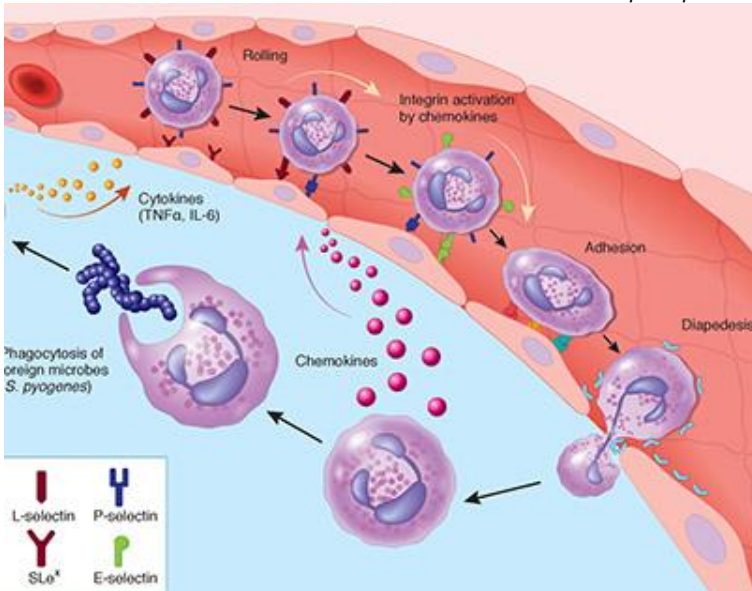


Рис. 3.3 Трансміграція нейтрофілів для фагоцитозу бактерії (https://www.behance.net/gallery/96260879/Neutrophil-Diapedesis?tracking_source=search_projects_recommended%7CNeutrophil)

Найбільш численним типом клітин крові є **нейтрофіли**. На їх долю припадає до 70% всіх ядерних клітин. **Нейтрофіли** – «мікрофагоцити» здатні фагоцитувати мікроорганізми і повністю знищувати.

Особливу активність **нейтрофіли** проявляють по відношенню до **бактерій**. Для реалізації антибактеріальних властивостей нейтрофіл має багато механізмів внутрішньоклітинної та позаклітинної дії за участю кисню та без нього.

Завдяки таким властивостям існує абсолютно чітка залежність в периферичній крові - **чим більше виражений запальний процес бактеріальної етіології, тим більший відсотковий вміст нейтрофілів.**

Сучасний погляд на дослідження компонентів лейкоцитарної формули

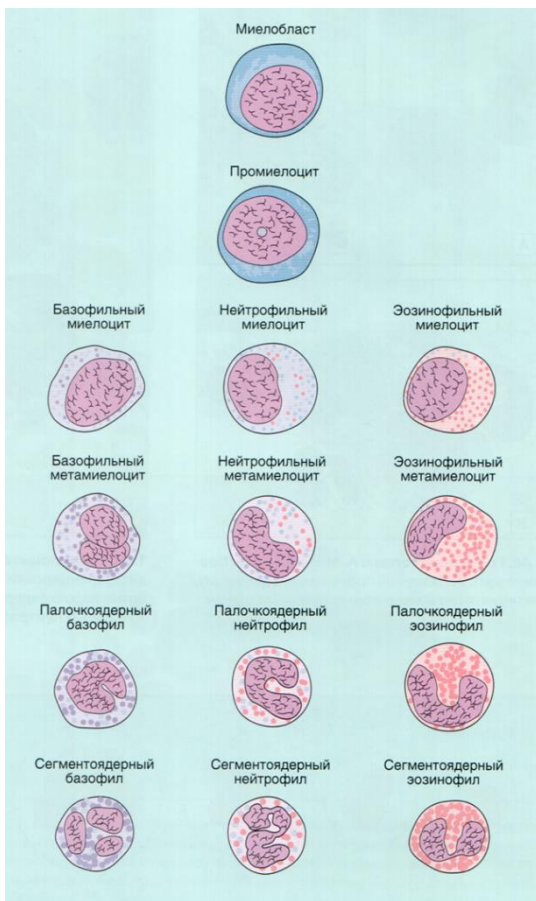


Рис.3.3. Диферон гранулоцитів.

У клінічній практиці другим за популярністю критерієм оцінки ступеню запалення є інтерпретація **лейкоцитарної формули**, яка відображає відсоткове співвідношення різних типів лейкоцитів до їх загального числа, що приймається за 100%. Згідно з прийнятими методичними умовами, лікар-лаборант візуально диференціює ядерні клітини в мазку та визначає їх абсолютну кількість у розрахунку на 100 одиниць.

В основі цього підходу є відмінність типів лейкоцитів за їх морфологічними ознаками: наявність або відсутність гранул, форма ядра, ядерно-цитоплазматичне співвідношення та склад гранул.

За рахунок малої вибірки для статистичного аналізу, та впливу суб'єктивних факторів на результат цього дослідження, **похибка відтворюваності результату** є дуже великою - біля 30%.

Головним критерієм зміни лейкоцитарної формули, який оцінює клініцист при діагностиці бактеріального запалення вважається збільшення кількості **палочкоядерних нейтрофілів** (вище 6% = 6 шт на 100 клітин). Зміна форми ядра із палочкоподібного на сегментоване – це ознака дозрівання клітини (рис. 3.3). Найбільшу фізіологічну активність мають сегментоядерні клітини за рахунок зменшеного ядерно-цитоплазматичного відношення і максимальної наповненості нейтрофілу гранулами для боротьби із бактерією. Після повного дозрівання вони виходять в кров.

Поява у периферичній крові менш диференційованих елементів свідчить про виснаження пулу гранулоцитів у кістковому мозку, підвищену проліферацію клітин і активну їх міграцію у вогнище запалення для знищення антигену, що клінічно супроводжується високою активністю бактеріальної інфекції.

Однак на практиці, при візуальній оцінці клітин на поверхні скла, навіть досвідченому спеціалісту, важко провести чітке диференціювання нейтрофілів і не помилитися, оскільки абсолютних критеріїв відмінності форм ядра – не існує. Враховуючи обмеження підрахунку в 100 клітин, вірогідність похибки дуже суттєва.

Тому, вже понад 15 років вважається, що метод візуального диференціювання клітин в складі лейкоцитарної формули із визначенням паличкоядерних нейтрофілів, **для визначення ознаки гострого запалення при скринінгових дослідженнях, втратив свою діагностичну цінність.**

Варто підкреслити важливість в клінічній практиці, **особливо в клінічній гематології**, проведення морфологічного опису **клітин крові**, який виконується **за чіткими показаннями і призначенням**. В такому випадку, дослідження проводить лікар-лаборант гематолог, який має досвід, стандартизовані умови приготування препарату, а головне – проводить вивчення більшої кількості клітин (мінімум 500) і надає інформацію клініцисту **про морфологічні зміни клітин периферичної крові** у співставленні із клінічною картиною, скаргами пацієнта та перебігу захворювання.

Використання гематологічного аналізатора

Гематологічний аналізатор, це зручний, повністю автоматизований апарат, який виконує дослідження 1-ї проби протягом 50-60 секунд. Результат аналізу надається у вигляді протоколу - гемограми. Крім персональної ідентифікації пацієнта, у протоколі вказані результати вимірювання з аббревіатурою показників та графічні зображення у вигляді гістограм.

Навіть найпростіші геманалізатори здатні надавати 18-20 параметрів. Основний принцип аналізу клітин – кондуктометричний – заснований на оцінці обсягу (діаметру) клітини. Хоча існують апарати, які ідентифікують додатково хімічний вміст гранул клітин крові.

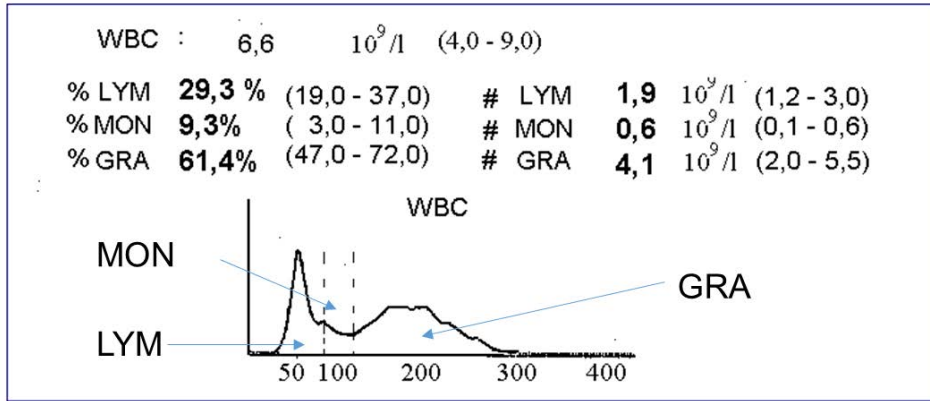
Перш за все рахується загальна кількість лейкоцитів, як найбільш крупних формених елементів крові, і апарат визначає параметр - WBC. Далі клітини оброблює спеціальна поверхнево-активна речовина і вони **зазнають стиснення** (зменшуються у розмірі), але не однаково, а в залежності від наявності в цитоплазмі пероксидазопозитивних гранул.

Таким чином, апарат поділяє усі лейкоцити (WBC); на три основні популяції: гранулоцити (GRA); лімфоцити (LYM) і так звані «середні клітини» (MID), - в деяких апаратах ця зона наведена моноцити (MON). Апарат вимірює кількість клітин в абсолютних (#) та відносних (%) числах (рис. 3.4).

На основі отриманих даних аналізатор будує криву – гістограму розподілу клітин по ширині (діаметру), де площа під кривою віддзеркалює пул різних типів лейкоцитів.

В зоні малих розмірів (35-90 фл) знаходяться **лімфоцити**, які значно зменшуються у розмірі. В області клітин великого розміру (120-400 фл) знаходяться **гранулоцити** (нейтрофіли, еозинофіли, базофіли). Вважається, що саме наявність пероксидази в гранулах клітин (найбільше її в нейтрофілах, значно менше - в еозинофілах і майже немає в базофілах) перешкоджає їх зменшенню у розмірі. Тому цікавою та наочною діагностичною ознакою активності нейтрофілів при бактеріальному запаленні є збільшення зони гранулоцитів на гістограмі, яка корелює із функціональною активністю гранулоцитів і їх наповнення гранулами.

Між двома цими піками є **зона середніх клітин** (MID або MON), яка найкраще співвідноситься з моноцитами.



Однак при вимірюванні клітин кондуктометричним методом в зону середніх клітин можуть потрапляти також базофіли та еозинофіли, особливо якщо вони частково або повністю дегранульовані, тому коректною назвою параметра слід вважати «середні» клітини (MID), а не моноцити.

Рис. 3.4 Фрагмент гемограми із лейкоцитарними показниками

Особливість гемограми при бактеріальній інфекції

Обов'язковою лабораторною ознакою гемограми при запаленні бактеріальної етіології буде **підвищення кількості нейтрофільних гранулоцитів** (рис.3.5). Гістограма WBC буде змінюватися за рахунок збільшення зони GRA, що також буде відбиватися на підвищенні відносної кількості гранулоцитів - %GRA у протоколі. При цьому, стадія і перебіг бактеріальної інфекції буде визначати зміну абсолютної кількості гранулоцитів і загальної кількості лейкоцитів.

Отже, при гострій фазі відповіді і викиду із кісткового мозку депонованих гранулоцитів, буде **підвищуватися #GRA** і відповідно (за рахунок цього) **збільшуватися WBC**. Що за результатом лабораторного дослідження буде визначено як «класична картина бактеріального запалення» лейкоцитоз за рахунок гранулоцитозу.



Рис. 3.5 Алгоритм оцінки гемограми

Якщо пул депонованих нейтрофілів в кістковому мозку вже вичерпаний, але активність бактерії продовжує стимулювати проліферацію гранулоцитів, показник **%GRA** буде **підвищений**, але показники **#GRA** і відповідно (за рахунок цього) **WBC** будуть в межах «норми». Ця ситуація потребує особливої уваги!

На тлі відсутності лейкоцитозу визначається відносний гранулоцитоз, що з точки зору патогенетичних механізмів свідчить **про погіршення стану**: «агресію» бактеріального вогнища, розвиток дефіциту зрілих лейкоцитів, посилену проліферацію в кістковому мозку, недозрівання нейтрофілів.

Особливість гемограми при вірусній інфекції

Ушкодження клітин організму вірусною ДНК/РНК призводить до включення механізмів активності лімфоцитів. Завдяки сигнальним молекулам від макрофагів, лімфоцити змінюють свій комплекс мембранних рецепторів і змінюють функцію.

Деякі клітини набувають цитотоксичну активність і сприяють безпосередній загибелі клітин, які пошкодженні вірусом. Інші – в межах імункомпетентних органів, перетворюються у плазматичні клітини і починають виробляти специфічні протеїнові комплекси – антитіла, для боротьби із інвазією вірусу та його наслідками при ушкодженні клітин.

На вказані морфо-функціональні зміни необхідний час, тому перша ефективна відповідь на потрапляння вірусу в організм відбувається через 5-7 діб і ніяк не відображаються на кількості лімфоцитів. Інші групи клітин периферичної крові не беруть активну участь у реалізації механізмів протівірусної відповіді, тому також не змінюються у кількості. Це означає, що дані гемограми при вірусній інфекції **не будуть мати ніяких суттєвих відмінностей**.

ЕРИТРОЦИТАРНІ ПАРАМЕТРИ ГЕМОГРАМИ

Параметри, які вимірюються

RBC (кількість еритроцитів), в нормі становить $3,7-5,1 \times 10^{12}$

HGB (концентрація гемоглобіну) 117-173 г/л

HCT (гематокрит) 360-480 л/л

NB! Ця величина гематокриту відноситься до еритроцитарних параметрів і відображає відношення обсягу виключно еритроцитів до обсягу плазми, яку вони займають. Показник дозволяє оцінювати реологічні властивості крові та інтерпретувати коливання об'єму циркулюючої крові.

Розрахункові величини:

MCV (середній об'єм еритроцитів); у нормі становить 80-95 фл

MCH (середній вміст гемоглобіну в еритроциті) – 27,0-34,0 pg

MCHC (середня концентрація гемоглобіну в еритроциті) – 330-380 g/l

RDW (розподіл еритроцитів за обсягом, шириною) – 11,5-14,5%.

На підставі еритроцитарних індексів, анемії розділені на мікро-, нормо- та макроцитарні залежно від величини клітини за MCV, і нормо-, гіпо- та гіперхромні по MCH.

Отримані індекси необхідно інтерпретувати у комплексі із морфологічною картиною клітин у мазку та клінічною картиною пацієнта. За цими параметрами проводиться оцінка анізоцитозу (*коливання клітин за розміром*) еритроцитів та їх морфо-функціональна характеристика.

Оцінка анізоцитозу

Для оцінки анізоцитозу еритроцитів у популяції використовують три показники: MCV, RDW та гістограму розподілу еритроцитів по ширині.

Фізіологічний анізоцитоз (6-9 фл) забезпечується постійною зміною розміру клітини протягом життя. Молоді клітини, що надходять із кісткового мозку, іноді досягають 10 мкм (у тому числі, ретикулоцити). Протягом життя із еритроцитом відбувається необоротне зменшення його поверхні (до 6 мкм) внаслідок мікровезикуляції, оскільки мембрана клітини регулярно пошкоджується через механічне проштовхування у мікросудинах. Пошкоджена ділянка мембрани випинається зовні у вигляді мікровезикули та злуцується макрофагами селезінки. Вважається, «вік» клітини можна оцінювати за її діаметром (ступенем його зменшення).

У кожного конкретного пацієнта, за відсутності патології з боку кровотворення, MCV є досить стабільним показником. Зміни MCV можуть дати корисну інформацію про різні порушення в організмі, які пов'язані як безпосередньо з еритроцитами, так і загального характеру.

Наприклад, активація процесів перекисного окислення ліпідів при різних патологічних станах (наприклад, хронічному запаленні, гіпоксії тощо) призводить до збільшення ділянок пошкодженої

мембрани та посилення процесів мікровезикуляції. Також мікроцитоз описаний на тлі хронічного вірусоносійства. У той же час, зміна MCV може бути відображенням зсуву водно-електролітного балансу. Підвищене значення MCV свідчить про гіпотонічні порушення водно-електролітного балансу, тоді як зниження – про гіпертонічні.

Інформативним показником анізоцитозу вважається RDW, а також зміна гістограми розподілу еритроцитів по ширині. Розмір RDW у нормі - 11,5-14,5%. Високе значення RDW означає гетерогенність популяції еритроцитів або наявність у пробі крові кількох популяцій еритроцитів (наприклад, після переливання крові). Низьке значення RDW - про гомогенність популяції, що також є порушенням: або переважному генезу нових клітин, або передчасної загибелі зрілих еритроцитів.

Необхідно враховувати, що MCV може мати нормальне значення за наявності у пацієнта одночасно вираженого макро- та мікроцитозу, тому MCV завжди слід розглядати у сукупності з еритроцитарною гістограмою та показником RDW.

Розподіл усіх еритроцитів по ширині в абсолютних числах відображається на гістограмі (рис.3.6). Крива розподілу в нормі - мономодальна і відображає переважність нормоцитів при невеликій присутності макро- і мікроцитів.

Деформація кривої відображає наявність або переважання клітин іншого розміру. Так, наприклад, поява додаткової моди в зоні макроцитів, як правило, є ознакою крововтрати і масивної регенерації клітин більшого розміру (ретикулоцитів).

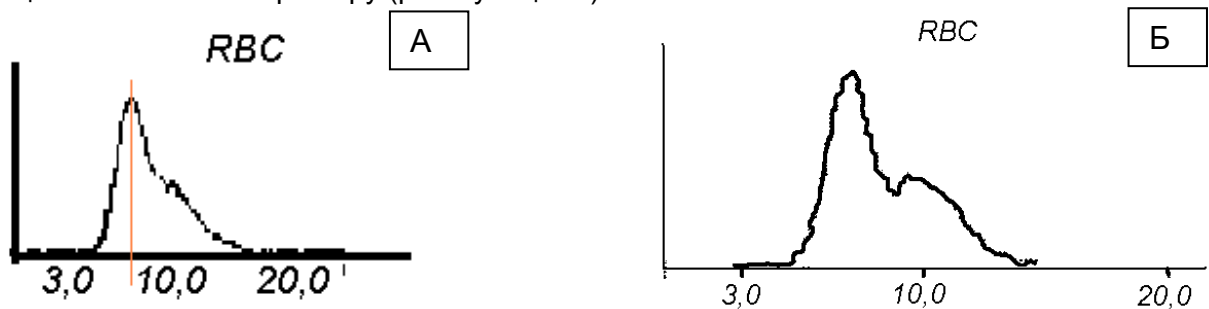


Рис.3.6 Еритроцитарна гістограма у нормі - А. Бімодальна еритроцитарна гістограма з появою крупних клітин – вірогідно ретикулоцитів після крововтрати- Б

Збільшення кількості еритроцитів може мати і реактивний (вторинний, симптоматичний) генез. Найчастіше, він розвивається внаслідок гіперпродукції ЕПО у відповідь на тканинну гіпоксію, причини якої можуть бути різні. Ці еритроцитози можуть бути транзиторними та супроводжуватися невисоким ретикулоцитозом.

Функціональна характеристика еритроцитів. Ланцюг синтезу гемоглобіну

Функціональні характеристики еритроцитів віддзеркалюються двома індексами: **МСН** та **МСНС**. Як правило, їх використовують для оцінки спроможності клітин транспортувати гази, молекулами гемоглобіну і діагностики анемії.

МСН - обчислюється, і інтерпретується як і колірний показник (КП).

МСНС характеризує не так кількість гемоглобіну в клітині, а і його концентрацію в залежності від об'єму самого еритроциту і характеризує «насиченість» еритроциту гемоглобіном.

Низький показник **HGB** може бути ознакою анемії і потребувати корекції. Однак, перед призначенням препаратів заліза, важливим є оцінка не лише зазначених індексів гемограми, але й спроможності усього **гемоглобінового ланцюжка**.

В лабораторії це виконують за допомогою біохімічного дослідження **вмісту трансферину, рецепторів до трансферину та концентрації феритину**.

Синтез гемоглобіну в еритробласті

Залізо проникає в клітину разом із трансфериним за механізмом рецептор-опосередкованого ендоцитозу (завдяки рецепторам до трансферину CD-71). На тлі низького рН залізо вивільняється та з'єднується з протопорфірином, та сукциніл-КоА із утворенням гему. Регулятором синтезу гему із заліза і його «депо» є **феритин**.

Глобін синтезується у клітині на рибосомах. Молекула гема і один з ланцюгів глобіну створюють субодиницю гемоглобіну; чотири субодиниці утворюють молекулу **гемоглобіну**.

Позбавлений заліза трансферин (апотрансферин) повертається у плазму, а рецептор трансферину – на клітинну мембрану.

Гіпохромна анемія в наслідок порушення синтезу гема розвивається не лише при дефіциті заліза, а й як недостатності трансферину, неспроможності рецепторів чи інших причин. Тому призначення препаратів, що заміщають залізо, важливим є чітке уявлення про механізми порушення.

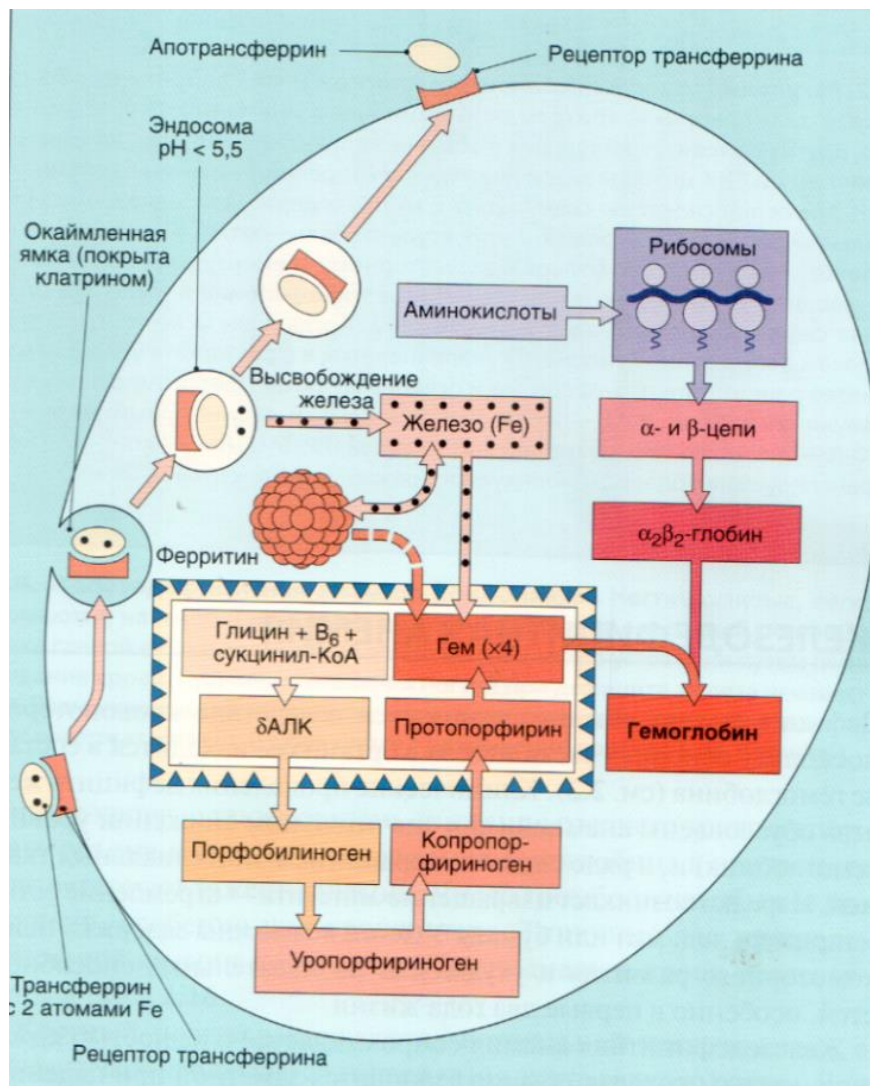


Рис. 3.7 Схема синтезу гемоглобіну (Луговська 2006)

Приклад розгляду протоколу та інтерпретації індексів

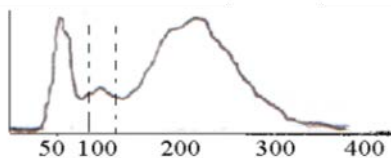
Завдання. Чоловік, 64 роки, вступив до хірургічного відділення у п'ятницю ввечері. Скарги на слабкість, запаморочення, біль у попереку. Тиждень тому було виконано лапароскопічну операцію з видалення кісти в черевній порожнині. Вчора ввечері стан погіршився, температура піднялася до 37,7 °C.

У приймальному відділенні взяли кров для клінічного аналізу та виконали аналіз за допомогою геманалізатору та підрахунок лейкоформули.

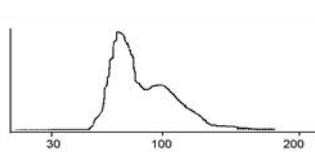
Е-1 , П-8 , С - 67, Л - 15, М - 9

WBC	6,8	$10^9/l$	4,0-9,0	MCV	88	fl	80-95
RBC	2,4 L	$10^{12}/l$	3,7-5,1	MCH	30.6	pg	27-34
HGB	73 L	g/l	117-173	MCHC	348	g/l	330-380
HCT	0.211 L	l/l	0,36-0,48	RDW	12.4	%	11,5-14,5
PLT	184	$10^9/l$	180-320	MPV	8.0	fl	6,2-10,0
PCT	0,14 L	$10^{-2}/l$	0,15-0,32	PDW	13.4	%	10,0-17,3
LYM	16.9	%	19,0-37,0	LYM	1.1	$10^9/l$	1,2-3,0
MON	7.0	%	3,0-11,0	MON	0.4	$10^9/l$	0,1-0,6
GRA	76.1 H	%	47,0-72,0	GRA	5.3	$10^9/l$	2,0-5,5

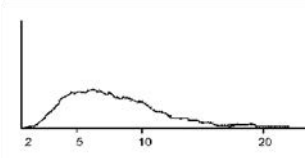
WBC



RBC



PLT



Оцініть стан білої крові. Чи є запальний процес в організмі? Якщо так, який інфекційний агент є причиною запальної реакції?

Так, причиною запального процесу є бактеріальний агент. Ймовірно, ускладнення після операції. Про це свідчить зміна гістограми WBC - збільшення зони гранулоцитів. Це узгоджується із анамнезом, станом, скаргами.

Найбільш інформативним виглядає відносна кількість гранулоцитів. Лейкоформула малоінформативна.

2. Оцініть стан червоної крові. Чи є ознаки анемії? Які критерії дають змогу охарактеризувати адекватність змін еритроцитів периферичної крові анамнезу пацієнта?

Так, анемія, ймовірно, постгеморагічна, зменшено всі показники кількості еритроцитів, гемоглобіну та гематокриту. Двомодальна гістограма RBC

3. Оцініть показники тромбоцитів.

Зниження тромбоцитів свідчить про гостру крововтрату

4. Які рекомендації ви дасте пацієнтові? Чи є необхідність виконувати інші види лабораторних досліджень для встановлення остаточного діагнозу?

Ні, необхідно інструментальне дослідження, УЗД, зупинка внутрішньої кровотечі, і, ймовірно, антибактеріальна терапія

ТЕМА 4

Клініко-лабораторні алгоритми оцінки системи гемостазу в організмі

Система гемостазу через поєднання і взаємодію механізмів коагуляції/антикоагуляції виконує важливу функцію збереження рідинного стану крові для забезпечення транспорту речовин та клітин. Основними загрозливими для життя наслідками порушення системи гемостазу вважається виникнення тривалої кровотечі, або спонтанне тромбоутворення. Система гемостазу також приймає участь у забезпеченні ряду важливих функцій, як то підтримання ендотеліальної цілісності, забезпечення трансміграції лейкоцитів і участь у реалізації відповіді на запалення, збереження об'єму циркулюючої крові і т.п.

Розуміння механізмів, що викликають дисбаланс системи, а також їх успішна корекція необхідна для: попередження післяопераційних кровотеч та тромбоемболічної хвороби, зниження летальності при критичних станах, що протікають із ДВС-синдромом, лікування звичного невиношування вагітності, визначення причин кровотеч або тромбозів, підбір специфічних медикаментів та їх дозування для профілактики цих ускладнень, забезпечення принципів контрольованої терапії антикоагулянтами, тромболітиками, факторами замісної терапії та ін

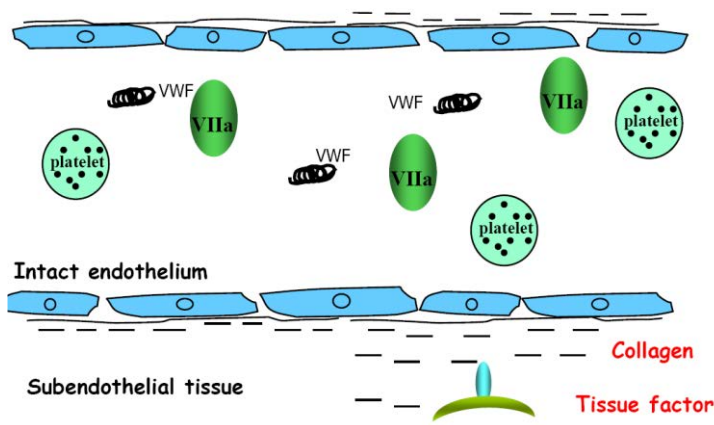


Рис. 4.1. Система гемостазу в спокої: ініціатори - (колаген судин, тканинний тромбопластин) і кофактор (тромбоцити, фактор Віллебранда, VII) відокремлені інтактним ендотелієм

(<https://present5.com/massivnye-krovotecheniya-i-koagulopatiya-travmy-i-krivskij-frca/>)

факторів коагуляції), які роблять її більш схильною до утворення тромбів. (рис. 4.2)

При ушкодженні судини і кровотечі запускається ланцюг реакцій, який поділяють на етапи:

Судинно-тромбоцитарний гемостаз включає рефлекторне звуження судин (вазоконстрикція, триває кілька секунд); і утворення первинної тромбоцитарної пробки - до 2 хвилин;

Коагуляційний - утворення фібринового згустку - 5-15 хвилин;

Фібриноліз - процес припинення утворення фібрину, деградація залишків фібрину, репарація (загоєння рани і відновлення кровотоку) від декількох хвилин до декількох годин, днів.

Їх описують як послідовні етапи, але в організмі вони щільно пов'язані і головне – мають спільних ініціаторів та починаються одночасно.(рис. 4.3)

Відсутність згортання крові в непошкодженій судині забезпечує інтактний ендотелій, який розмежовує учасників подій тромбоутворення: тромбоцити, фактори згортання плазми та субендотеліальні структури (тканинний фактор, колаген) (рис. 4.1).

З часів Рудольфа Вірхова (1856 р.) відома триада чинників, які ініціюють механізм спонтанного внутрисудинного тромбоутворення і відповідно визначають контингент пацієнтів, які мають загрозу тромбозів.

Триада включає 1) уповільнення кровотоку, венозний застій; 2) порушення структури судини (дисфункція ендотеліальних клітин як наслідок запалення низького ступеня) і 3) гіперкоагуляція - зміни самої крові (згущення, підвищення концентрації

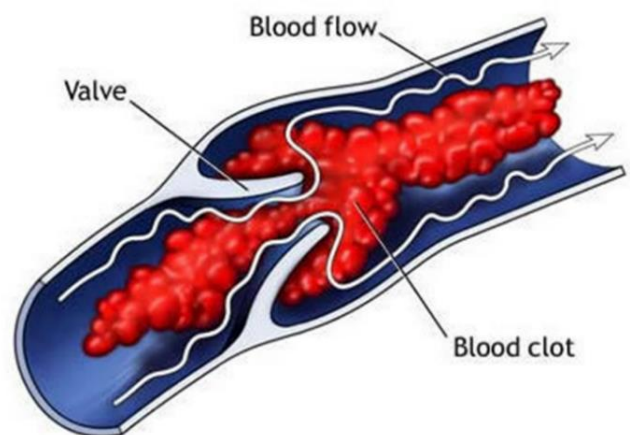


Рис. 4.2. Схема утворення тромбу в судині. (<https://wdrfree.com/stock-vector/venosa>)



Рис. 4.3. Схема етапів гемостазу

9

Судинно-тромбоцитарний гемостаз

У ньому беруть участь в основному ендотелій судини і тромбоцити. Тривалість 3-5 хвилин. Результат - утворення тромбоцитарного тромбу, припинення кровотечі із капіляра (дрібної судини). Через декілька хвилин тромб стискається, зменшується у розмірі і кровотік по судині поновлюється.

При травмі кровоносної судини рефлекторно виникає її спазм в місці пошкодження, це припиняє або, значно знижує крововтрату. Відбувається адгезія (прилипання) тромбоцитів до країв пошкодженої судини (рис 4.4). *Фактор Віллебранда* забезпечує взаємодію активних тромбоцитів з колагеном стінки судин. При цьому з гранул тромбоцитів вивільнюється аденозиндифосфат (АДФ), серотонін і адреналін, що посилює судинний спазм і агрегацію тромбоцитів. В результаті формується первинний, білий тромбоцитарний тромб.

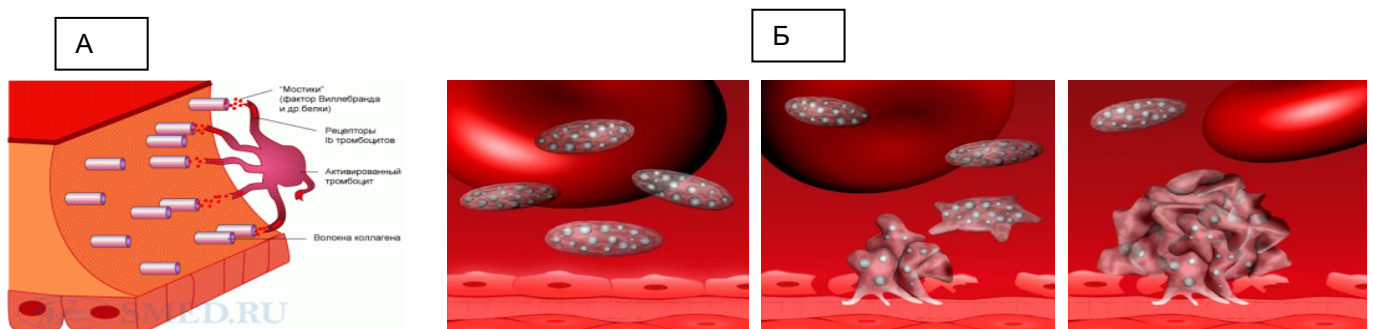


Рис. 4.4. «Метаморфоз» тромбоцита для більш міцного поєднання із колагеном субендотеліальних структур -А, утворення тромбозного згустка при пошкодженні ендотелію – Б.
(<https://thepresentation.ru/medetsina/gemostaz-sistema-gemostaz>)

Коагуляційний гемостаз

У ньому беруть участь фактори згортання, що перебувають у плазмі і тромбоцитарний фактор із субендотелію. Ця фаза триває 5-10 хвилин. Кінцевий продукт – нерозчинний фібрин, який вплітається у волокна колагену сполучної тканини і забезпечує репарацію стінки судини.

Система гемостазу - багатоступінчастий ферментативний процес в якому відбувається каскадне інтенсивне нарощування кількості активних молекул. Наприклад одна молекула фактору IXa активує кілька десятків молекул фактору X, а одна молекула Xa великий пул молекул фактора II (протромбін) і т.д. Утворені активні молекули поєднуються у комплекси, що мають ферментну активність, а в результаті утворюється нова біохімічна субстанція (протромбіназа, тромбін, фібрин, плазмін).

Зважаючи на складність системи, існують теорії, які пояснюють послідовність процесів. Вважається, що «клітинна» теорія (Hoffman M., 2001 р.) надає більш природне уявлення про механізми та роль клітин, в тому числі тромбоцитів у процесі тромбоутворення. Однак, найбільшу популярність має «каскадна» теорія (1969 р.), яка пояснює логіку лабораторної діагностики плазмової ланки гемостазу (рис. 4 5).

Згідно цієї теорії, фінальне утворення нитки нерозчинного фібрину із неактивного фібриногену ініціюється «тромбіновим вибухом» - великою кількістю тромбіну, який, в свою чергу, утворився із неактивного попередника протромбіну. Ці процеси проходять дуже швидко, практично миттєво. А от для активації протромбіну потрібна у достатній кількості особлива речовина-каталізатор – активна протромбіназа. Для її утворення протягом 4-6 хвилин в плазмі (на мембранах клітин, ендотелії у місті пошкодження) здійснюється ряд біохімічних реакцій в результаті яких фактори згортання активуються і збільшуються у кількості (як каскад).

Початковим ініціатором каскаду можуть виступати різні обставини: якщо процес тромбоутворення виник у середині судини без втручання екзогенних учасників, вважають, запустився ВНУТРІШНІЙ шлях гемостазу, якщо процес почався на тлі пошкодження судини і контакту тканинного фактору із плазмовими факторами – то активувався ЗОВНІШНІЙ шлях гемостазу.

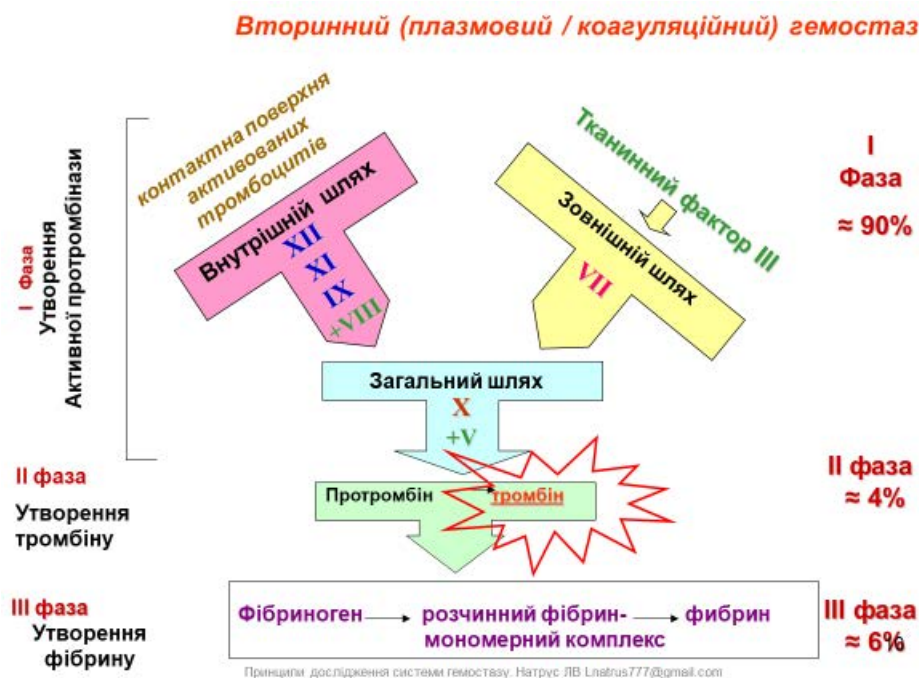


Рис. 4.5. Схематичне зображення двох шляхів каскадної теорії гемостазу

Тромбін впливає на **фібриноген**, перетворюючи його в активну молекулу **фібрин-мономер**, який поступово полімеризується у димери, олігомери. Ці комплекси активні, вони прагнуть з'єднатися між собою і є небезпечними, оскільки поступово перетворюються у

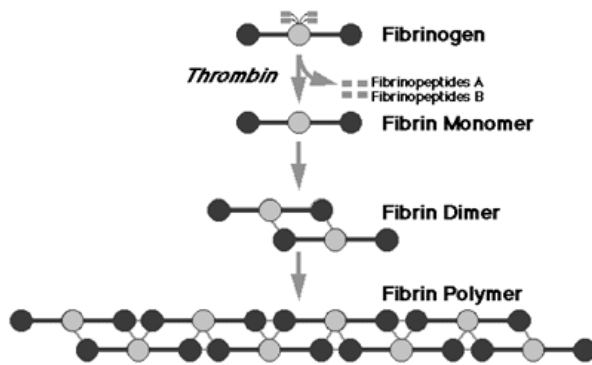


Рис. 4.6. Схема утворення нерозчинного фібрину полімеру

структуру. Їх наростання в плазмі свідчить про активний процес утворення тромбу! Мономери і димери фібрину можуть розчинятися гепарином, фібринолізином, сечовиною, тому називаються **розчинні фібрин-мономерні комплекси (РФМК)**.

Ущільнення фібрин-полімеру робить його нерозчинним. Міцна нитка нерозчинного фібрину має властивості схожі на колаген, тому вплітається в волокна субендотеліальної сполучної тканини і забезпечує міцне «зшивання» пошкодженої стінки судини (рис. 4.6)

Завершальний етап - **фібриноліз**.

Цей процес обов'язковим на шляху регенерації (репарації) ушкодженої судинної стінки. Включається він одночасно із активацією коагуляції і протікає паралельно із нею, приводить до переривання подальшого фібриноутворення і розчинення залишків фібрину, які зайві і не використані для репарації ушкодженої судинної стінки і встановлення кровотоку цією судиною. Тривалість процесів досягає 48-72 годин.

Фібриноліз забезпечується **плазміном**, який утворився із неактивного плазміногену. Плазмін розрізає фібрин полімер на шматочки, які утилізують макрофаги. Розмір деградованого фібрину дорівнює двом мономерам, тому має назву **Д-димер**. Позначка «Д» - означає «*Деградаційний*» (результат деградації) димер фібрину. Це означає, що він вже неактивний, нічого приєднувати не може і не створює потенційну загрозу для нового тромбу. Д-димер, як і інші **продукти деградації фібрину (ПДФ)**, означає, що в судині іде фібриноліз (рис. 4.7). Причому їх наростання при проведенні тромболітичної терапії часто свідчить про ефективність лікування.

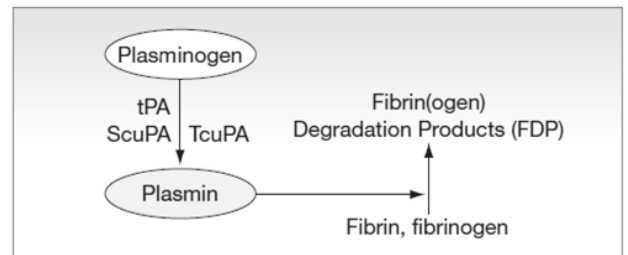


Рис. 4.7. Схема фінального шляху фібринолізу

Важливо пам'ятати, що два процесу: *утворення нерозчинного фібрину* та *фібриноліз* мають йти узгоджено за часом. Залишки фібрину мають бути розчинені лише після завершення репарації судинної стінки, і не раніше – оскільки це складає умови для кровотечі. Водночас, несвоєчасне припинення фібриноутворення призведе до тромбозу судини і буде перешкоджати кровотоку.

Особливості дослідження системи гемостазу

Головною ідеологією коагуляційних тестів є вимірювання часу, (тривалості у секундах) кожного етапу для уявлення про своєчасність процесів у системі (рис. 4.8).

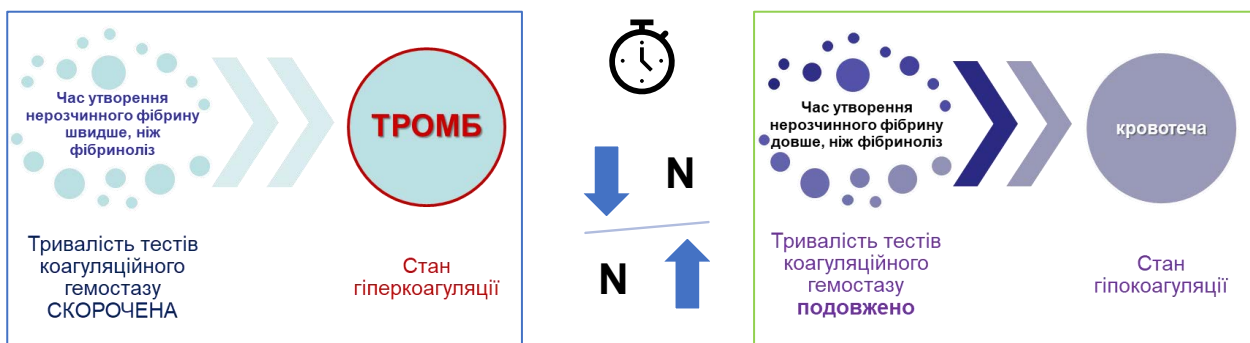


Рис. 4.8. Ідеологія часових тестів гемостазу

Оцінка тромбоцитарної ланки гемостазу

При дослідженні судинно-тромбоцитарного гемостазу використовуються глобальні тести: час згортання по Лі-Уайту, тривалість кровотечі по Айві, (Дюке) в основі яких лежать різні модифікації вимірювання часу згортання цільної крові при проколі дрібних судин шкіри, або в пробірці. У результаті лікар отримує інформацію про загальну спроможність тромбоцитів формувати тромбіновий тромб і зупиняти кровотечу, що *використовується для експрес-діагностики найбільш важких (грубих) порушень згортання крові.*

Не зважаючи на низьку специфічність тесту, він має значну інформативність та доступність, тому є дуже популярним у лабораторіях

Використання гематологічних аналізаторів дозволяє визначити показники **тромбоцитів**:

PLT - кількість тромбоцитів. Норма від 180-320 • 10⁹ / л; при виході за ці межі рекомендована мікроскопія мазку.

MPV - середній об'єм тромбоцитів. Норма: 8,6-9,5 фл

PDV - ширина розподілу тромбоцитів за об'ємом відображає ступінь анізоцитозу тромбоцитів. Норма = 14-18%.

PCT - тромбокрит частка обсягу цільної крові, яку займає тромбоцитами (аналогічний Hct). Норма = 0,15-0,40%.

Збільшення часу кровотечі при нормальному вмісті тромбоцитів (за даними геманалізатору) може свідчити про порушення функції тромбоцитів. Для з'ясування причини варто продовжити діагностичний алгоритм та досліджувати їх властивості шляхом агрегатограми, тромбоеластограми тощо.

Дослідження плазмової ланки (коагуляційного) гемостазу

При дослідженні плазмового гемостазу використовуються ряд тестів:

Скринінгові	Уточнюючі
✓ АЧТЧ - визначення активованого частково тромбопластинового часу, ✓ Протромбіновий тест (П-Час, П-Відношення, П-Індекс) ✓ Рівень фібриногену в плазмі	• Тромбіновий час • РФМК • Д-димер • МНВ

Популярність каскадної теорії пояснюється тим, що лабораторні тести вимірюють час утворення нерозчинного фібрину вказаними шляхами гемостазу. Тест АЧТЧ – вимірює «тривалість» процесів внутрішнього шляху, а ПЧ – зовнішнього. Їх інтерпретація дозволяє уявити спроможність учасників і СВОЄЧАСНІСТЬ фібриноутворення в організмі пацієнта, а також дозволяє відокремити «фактори-учасники» процесу.

Оскільки, в зовнішньому шляху залучені фактори II, VII, X, I, V, а в внутрішньому – XII, XI, IX, VIII значить при подовженні відповідних тестів можна думати про дефіцит вказаної групи факторів.

Якщо час вказаних тестів скорочується – хоча б за одним із шляхів – це надає підставу думати про стан гіперкоагуляції (підвищену активність факторів згортання) та загрозу тромбоутворення. При чому, скорочення АЧТЧ – може загрожувати спонтанним тромбоутворенням, наприклад на тлі цукрового діабету, серцевої недостатності, аритмії тощо; а скорочення ПЧ – тромбоутворенням після масивного пошкодження тканин, наприклад після оперативного втручання.

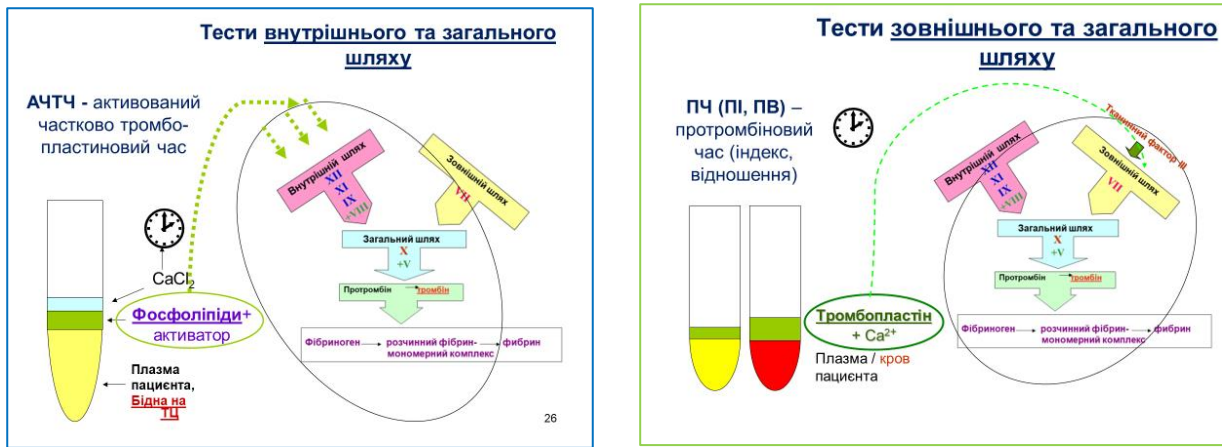


Рис. 4.9. Схематичне зображення моделі відтворення лабораторних методик

Принцип методики полягає в тому, що в лабораторії створюють модель тромбоутворення *in vitro* за вказаними шляхами. До плазми пацієнта в якій **збережені (!) і активні (!) усі плазмові фактори**, додають відповідний активатор, що є ініціатором каскаду, і заміряють час утворення фібринової нитки. Автоматичний аналізатор – коагулометр – при ідентифікації нерозчинного фібрину вмикає секундомір (рис. 4.9). Для тесту ПЧ – використовують реактив *тканинний фактор*, імітуючи пошкодження судини і запускають каскад із зовнішнього шляху, а для тесту АЧТЧ – коалінову суміш (фосфоліпідні мембрани), як модель клітинної поверхні на якій активуються фактори.

Для клініциста, що замовляє в лабораторії тести коагулограми, важливо розуміти принцип методики, щоб бути освіченим про можливість лабораторної помилки, що може виникнути через порушення преаналітичного етапу та суттєво змінити результат аналізу.

При узятті крові, особливо у пацієнта із **гіперкоагуляцією**, при накладанні джгута, проколі голкою шкіри та попаданні крові із судини в пробірку, починається процес утворення тромбу, як фізіологічний механізм захисту від ушкодження. При цьому, частина плазмових факторів використовується на утворення протромбінази і активацію тромбіну. Інколи, в пробірці із плазмою, яка отримана в лабораторії вже ідентифікуються мікроскопічні згустки фібрину! Решта факторів, яка залишилася в плазмі, складає менше 50% від їх кількості в судинному руслі, вступає у реакції каскаду, але демонструє стан **гіпокоагуляції**, або попадає у **межі нормального часу**.

В ході такого дослідження, лікар отримує із лабораторії результат, який не відповідає клінічній картині, попередньому діагнозу і може заплутати клініциста щодо подальшої тактики ведення пацієнта.

Лабораторне монітування терапії системи згортання. Показник МНВ

Препарати, що знижують згортання крові представлені наступними групами: а) **дезагреганти** (аспірин, плавікс і ін.) б) **антикоагулянти**: прямі - гепарин, низькомолекулярні гепарини (НМГ): непрямі - (синонім: антикоагулянти непрямої дії - АНД) варфарин, синкумар, і ін. **тромболітики** (стрептокіназа, акти лізе).

Деагреганти - *препарати інгібують тромбоцити* і, отже, в процесі їх застосування необхідний контроль за функцією тромбоцитів **на агрегометрі**.

Точкою прямого антикоагулянту **гепарину** є внутрішній шлях, тому при гепаринотерапії доцільно вимірювати АЧТЧ. Низькомолекулярні гепарини НМГ (фраксипарин, клексан і т.д.) в терапевтичних дозах не впливають на значення АЧТЧ, і в цьому випадку для контролю антикоагулянтної терапії слід використовувати визначення РФМК. Якщо терапія ефективна РФМК будуть знижуватися.

При лікуванні непрямими антикоагулянтами ПТ недостатньо інформативний. Основним і єдиним достовірним методом оцінки застосування непрямих антикоагулянтів є вимір ПВ з подальшим розрахунком **міжнародного нормалізованого відношення – (МНВ)**.

Принцип дії **непрямих антикоагулянтів варфаринового ряду** полягає в конкурентній взаємодії із вітаміном К за рецептори гепатоцитів при синтезі факторів згортання. Вітамін К (хінін) відноситься до жиророзчинних вітамінів, надходить в організм з їжею, а також синтезується мікрофлорою кишківника. В системі гемостазу є фактори, для повноцінного функціонування яких необхідний вітамін К. Їх називаються вітамін **К-залежними факторами**. До них відносяться: фактор II (протромбін), фактори VII, IX, X і два антикоагулянти - протеїн С і протеїн S. Після синтезу в гепатоцитах вони вимагають певної модифікації. При відсутності вітаміну К цей процес блокується, що призводить до синтезу **функціонально неповноцінних факторів згортання**, які не можуть взаємодіяти з іонами Ca^{2+} , фосфоліпідними поверхнями і формувати активні комплекси необхідні для згортання крові.

Такі «неповноцінні» фактори називаються «білками, що з'являються при відсутності вітаміну К» і позначаються від абревіатури «PIVKA» (*Problem-induced by vitamin K absence*). У крові пацієнтів на тлі прийому пероральних антикоагулянтів групи кумаринів (**дикумарол, кумадіна, синтра, маркумар, варфарин**), утворюється багато PIVKA, які виключаються з процесу згортання крові і, як наслідок цього, розвивається стан гіпокоагуляції. При відтворенні тесті ПЧ використовують реактив – «тромбопластин» різного виробництва. Реакція факторів PIVKA із тромбопластинами суттєво і різнобічно змінює результат, що заважає інтерпретації тесту.

У 1981 році був розроблений метод стандартизації ПТ, для контролю і оптимізації терапії оральними антикоагулянтами. Згідно інструкції, в лабораторії аналізатор розраховує МНВ, за формулою, яка використовує виміряне ПЧ пацієнта і Міжнародний індекс чутливості (МІЧ) тромбопластину.

$$\text{МНВ} = \left(\frac{\text{ПЧ пац}}{\text{СНПЧ}} \right)^{\text{МІЧ}} \quad \begin{array}{l} \text{де ПЧпац - ПЧ пацієнта в сек,} \\ \text{СНПЧ середнє нормальне ПЧ в сек,} \\ \text{МІЧ міжнародний індекс чутливості тромбопластину.} \end{array}$$

Усі ці розрахунки виконує апарат, в який при калібруванні вносять показники СНПЧ та МІЧ (з кожним новим лотом тромбопластину).

Рекомендовано при визначенні дози антикоагулянтів орієнтуватися на межі МНВ від 2,0 до 3,5, що свідчить про досягнення ефекту гіпокоагуляції. Як правило, найбільш оптимальним значенням при терапії вважається МНВ = 2,3-2,4., але головний критерій - стан пацієнта. Більш того чекати зміну МНВ слід не раніш ніж на 4-5 добу після початку прийому антикоагулянту, по мірі кумуляції ефекту. Частота визначення МНВ: на початку лікування щоденно з показником АЧТЧ; при стабільному рівні МНВ щотижня, потім щомісяця.

ТЕМА 5

Клініко-лабораторні алгоритми діагностики інфекційного процесу в організмі

Питома вага хронічних інфекційних захворювань у загальній патології людини залишається значною, становить біля 70% від усіх захворювань, що реєструються в популяції. Агенти, що викликають ці захворювання, складають п'ять груп: віруси, бактерії, гриби, найпростіші та гельмінти. Левову долю інфекцій викликають віруси та бактерії.

При цьому, багато інфекційних агентів відносяться до так званої *латентної* або *опортуністичної* групи, виявлення яких **не завжди є доказом їх участі в патологічному процесі**. Іноді інфекційний агент може бути виявлений, проте його участь у патогенезі захворювання виявляється мінімальною або взагалі відсутня, оскільки в даному випадку він є *сапрофітною флорою*. Тоді усі лікувальні заходи є необґрунтованими.

Для того, щоб призначати етіологічне лікування, необхідно проводити комплексне дослідження, для **точного визначення ролі патогену у конкретній клінічній картині**.

Методи лабораторної діагностики інфекційних захворювань (рис. 5.1):

прямі, що дозволяють виявити в біологічних рідинах або тканинах інфекційні агенти (віруси або мікроорганізми): мікроскопія, ДНК-діагностика, бактеріологічний аналіз.

непрямі, що дозволяють характеризувати специфічну імунну відповідь організму (синтез і накопичення специфічних антитіл у плазмі), яка розвивається в результаті вторгнення інфекційного агенту.

В лабораторії визначення специфічних антитіл, перш за все IgG, IgM, IgA виконують в сироватці крові (тому і назва методів – серологічні). Найбільшого поширення серед серологічних методів набув імуноферментний аналіз (ІФА) та імунохемілюмінісцентний (ІХЛА).

В сучасній діагностиці **поєднання прямих і непрямих методів є абсолютно виправданим**, оскільки кожен з них має свою інформативність і додає лікарю певну інформацію про стадію та перебіг захворювання. Як правило, ці дослідження потребують спеціального обладнання та інфраструктури лабораторії, тому є коштовними та трудоемкими. Враховуючи значну вартість досліджень, вкрай важливим є правильно і своєчасне замовлене дослідження в лабораторію із вказанням середовища для аналізу, потенційного збудника та метода. Інколи, доцільно обстеження кількох вогнищ імовірної локалізації інфекційного агенту.

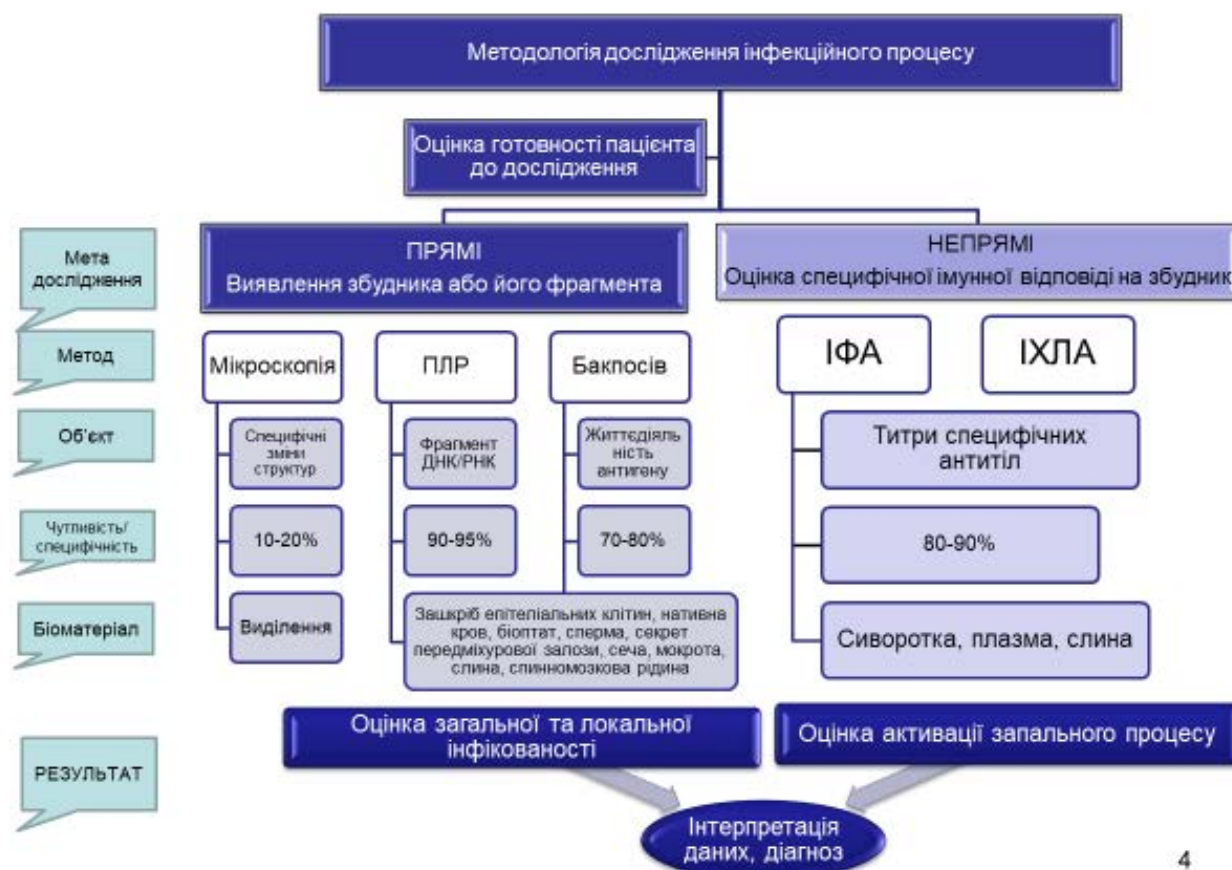


Рис.5.1. Схематичне уявлення методології дослідження інфекцій

ПРЯМІ МЕТОДИ

Мікроскопія

Мікроскопія – це рутинний метод діагностики, який не потребує специфічного обладнання, а точність його результату залежить від кваліфікації виконавця. Метод широко доступний, проте малоінформативний, чутливість складає 10-12 %. Традиційно, мікроскопія урогенетального мазку виконується під час профілактичного огляду.

При мікроскопії використовується зіскрібок з будь-якого матеріалу, який можна фіксувати на скельці. Частіше за все це зіскріб уретри та/або цервікального каналу. Мікроскопічне дослідження дозволяє вивчити в матеріалі: клітинний склад, волокнисті та кристалічні утворення, орієнтовно оцінити стан мікробної флори, визначити морфотип бактерій, а також специфічні включення, лейкоцити, дріжджоподібні гриби тощо.

Верифікація грамнегативних диплококів, особливо при їх внутрішньоклітинному розташуванні, міцелію або бластоспор є підставою для попереднього діагнозу і проведення **уточнюючих додаткових досліджень, які мають більшу специфічність.**

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), технологія " Real - time "

Високі показники чутливості та специфічності (до 90%) полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) визначають її лідером лабораторній діагностиці по виявленню антигену. Для проведення ідентифікації збудника в середовищі достатньо наявності 1ї молекули його ДНК/РНК. Однак, ці дослідження дуже трудозатратні, виконуються в спеціальних стерильних боксах, потребують специфічне обладнання, реактиви і часто є дорогорватісними.

Принцип метода полягає швидкої ампліфікації (створенні значної кількості копій) молекул ДНК. В лабораторії, на етапі пробопідготовки, через проведення ряду послідовних процедур, відділяється осад в якому міститься ДНК хазяїна разом із ДНК антигену. Далі у пробу додається специфічний праймер - відомий фрагмент ДНК антигену, дизайн якого заздалегідь вивчений і синтезований в науковій лабораторії. Під впливом ферменту ДНК-полімерази, а також певних температурних умов, в пробі, яка містить ДНК антигену починається створювання копій молекул ДНК (процес ампліфікації) із вражаючою продуктивністю. За 90 хвилин із 1 молекули утворюються 100 млн копій (рис.5.2). Накопичення ДНК у кількості понад 100 млн створює умови для ідентифікації збудника і визначається як «позитивний» результат.

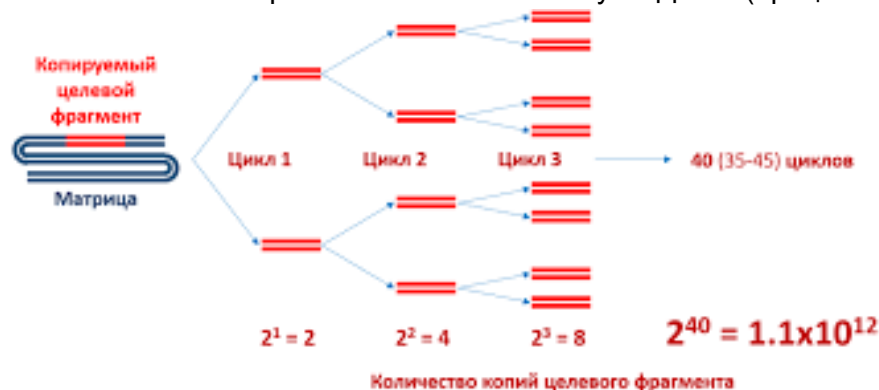


Рис.5.2. Принцип ампліфікації фрагменту ДНК

У випадку, коли в пробі немає молекул ДНК антигену, процес ампліфікації не виконується, і це розцінюють як «негативний» результат.

Важливе значення має правильне узяття біоматеріалу, який **потенційно вміщує клітини, заражені вірусом** із специфічним фрагментом ДНК/РНК. Тому, лікар-клініцист має визначити найбільш інформативне середовище для дослідження, надати пацієнту рекомендації для підготовки до процесу узяття. Якщо процедуру узяття матеріалу виконує клініцист, заздалегідь треба організувати умови узяття в спеціальні контейнери, консерванти тощо. Для **запобігання контамінації** необхідно витримувати умови стерильності та розмежування матеріалу дослідника і пацієнта (захисна маска, костюм, рукавички тощо).

Висока чутливість та специфічність метода ПЛР-реал тайм поєднується із певними його обмеженнями, при клінічній інтерпретації результату.

Отримання «хибнонегативного» результату може бути пов'язано із порушенням правил узяття матеріалу: попаданням в пробу крові, слизу, що гальмує реакцію.

При узятті проби відразу після курсу антибактеріального лікування (при ампліфікації ДНК загублого мікроорганізму) можна отримати «хибнопозитивні» з клінічної точки зору результати. Тому варто притримуватися рекомендацій щодо проведення повторних тестів через певні проміжки часу, які потрібні для повної елімінації збудника із організму.

Бактеріологічні дослідження

Незважаючи на стрімкий розвиток лабораторних технологій, «золотим стандартом» діагностики бактеріальних та ряду вірусних інфекцій залишаються мікробіологічні дослідження. **Бактеріологічний метод** (культуральний) забезпечує високу специфічність аналізу (до 80%). Сьогодні, завдяки використанню спеціальних комп'ютерних програм, можливе тестування близько 300 штамів збудника в будь-якому вигляді біоматеріалу з високою точністю та виконання **антибіотикограми** із зазначенням ефективності антибіотика, його **دوزи шляху та кратності** введення для кожного пацієнта.

Важливо пам'ятати, що цей вид дослідження є не лише трудозатратний та дороговартісний через спеціальні умови виконання, реактиви, обладнання, а й потребує певного часу.

Навіть при наявності сучасного обладнання, бактеріологічні дослідження проводяться у кілька етапів:

I етап: Первинний посів біоматеріалу. Виявлення орієнтовної чутливості мікробної асоціації до антибактеріальних препаратів. Мінімальний час виконання – 24 години.

II етап: Стандартна ідентифікація виділених збудників. Мінімальний час виконання – 24 години.

III етап: Визначення чутливості до антибактеріальних препаратів **для кожного** ідентифікованого збудника (24-48 годин).

Така процедура проводиться окремо із кожним видом біоматеріалу. Тому, при направленні в бактеріологічну лабораторію пацієнта, клініцист повинен **чітко вказати у замовленні яке біологічне середовище необхідно дослідити**.

У ході виконання II етапу аналізу, бактеріолог ідентифікує всі виявлені збудники, нормальні патогенні або умовно патогенні. Саме цей момент визначає трудоемкість дослідження. Оскільки, практично завжди, у кожному досліджуваному середовищі виявляється 2-4 види збудника. Особливо це притаманно ротової порожнини, зубояснавої кишені, носоглотки, піхви тощо.

Якщо ж лікар-клініцист у напрямку вказав, що у пацієнта потрібно взяти матеріал 2-3 біологічних середовищ (наприклад: глотка, носоглотка, мигдалина), бактеріолог проводить ідентифікацію всіх видів збудників. Їх може бути 9-12 і витрати на проведення аналізу значно зростають.

Патогенність мікроорганізму **визначає клініцист**, виходячи з клінічної картини, анамнезу, попередньої терапії тощо. У випадках коли у середовищі виявляється лише нормальна флора із значною кількістю колоніє утворюючих одиниць – КУО, її можливу патогенність також визначає клініцист, т.к. при імунodefіцитах або дисбіозах може спостерігатися опортунізація середовища нормальною флорою, що також може вимагати корекції при наявності клінічної картини.

Виявлення антигену за тим чи іншим методом, обов'язково має бути співставлене із клінічним перебігом, анамнезом, скаргами та об'єктивним станом пацієнта. Рішення про призначення специфічного лікування, або симптоматичної терапії приймає виключно клініцист, який спостерігає хворого.

У випадках, коли отримані із лабораторії **результати не співпадають** із уявленням клініциста про стан та перебіг захворювання, клініцисту необхідно ретельно проаналізувати усі фактори, від яких залежить результат лабораторного тесту: стадія захворювання,

тривалість перебування антигену в організмі, епідеміологічний стан, підготовка пацієнта до дослідження, прийом фармакологічних препаратів, умови узяття матеріалу, середовище для дослідження, чутливість, специфічність методу та реактивів, які використовує лабораторія тощо.

НЕПРЯМІ МЕТОДИ

Важливою характеристикою активності (агресії) в організмі **антигену не бактеріальної природи** є оцінка специфічного імунітету, який формується в організмі хазяїна у відповідь на втручання агенту. Згідно класичного уявлення, після першої зустрічі із антигеном (АГ) у період між 5 та 20 днями після появи клінічних симптомів захворювання послідовно в організмі синтезуються специфічні антитіла трьох класів IgM, IgA, IgG (рис.5.3). Антитіло-утворення забезпечують активовані лімфоцити в імунокомпетентних органах та лімфовузлах. При цьому кількість лімфоцитів в периферичній крові суттєво не збільшується.

Послідовність утворення і накопичення антитіл обумовлена основним функційними властивостями імуноглобулінів.

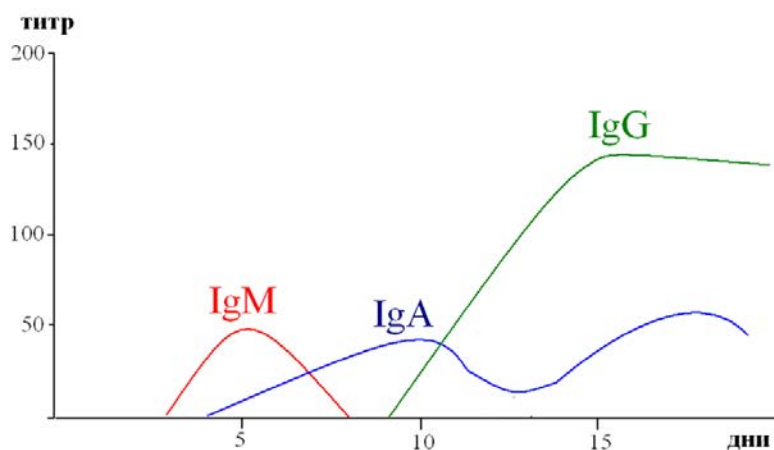


Рис.5.3. Послідовний синтез антитіл різних класів

Антитіла (АТ) гострої фази (первинні) Ig M накопичуються на 5-7 добу перебування антигену і максимально сприяють загибелі клітин, вражених антигеном.

Ig G – (вторинні) накопичуються пізніше, на 14-20 добу, забезпечують активацію гуморального імунітету, і ефективну відповідь при повторній зустрічі із АГ.

IgA (антитіла слизової оболонки) – синтезуються паралельно із первинними, в меншій кількості, але сприяють неспецифічному захисту слизової від інвазії АГ.

В клінічній практиці лабораторне виявлення Ig M до збудника використовують доволі рідко, через короткочасне перебування цих АТ в крові. Найбільшу популярність має визначення Ig G до конкретних антигенів. У випадку, коли генетично детермінований АГ потрапляє в організм повторно, титр наявних АТ класу G та A може підвищитися, про те Ig M - не виробляються. При нормальній імунореактивності, титр АТ класу G та A корелює із «агресивністю» збудника.

При інфікуванні респіраторним вірусом, який має сезонні зміни молекул ДНК/РНК в організмі будуть вироблятися нові специфічні АТ для «оновленого» вірусу. Тому, їх виявлення, ідентифікація не має інформативності.

В лабораторії виявлення та вимірювання титру АТ виконують в сироватці (або плазмі) крові за допомогою імунологічних методів. Найбільшого поширення серед серологічних методів набув твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА). Принципова схема наведена на рисунку 5.4.

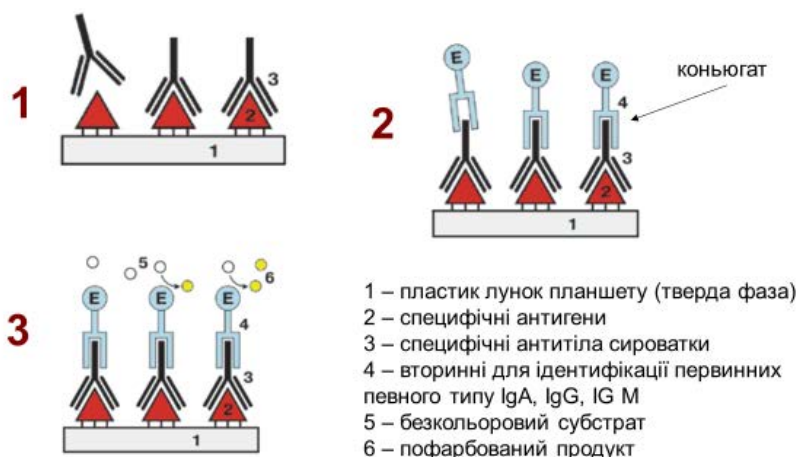


Рис.5.4. Принципова схема твердофазного ІФА

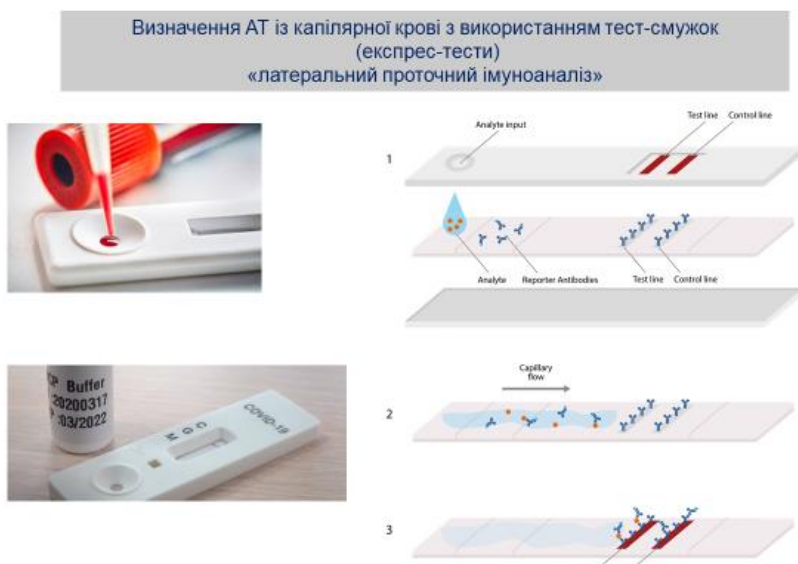
17

У ролі твердої фази використовують пластик луночки в яку помішають біоматеріал пацієнта – сироватку (плазму) із потенційними антитілами. Попередньо, на цей пластик нанесені відомі специфічні антигени. Створюють умови нагрівання до 37 град С та перемішування рідини у лунці. Завдяки природній компліментарності, АГ з'єднується із АТ у комплекс, який ідентифікують кон'югантом по типам

імуноглобулінів. І вже цей «сендвіч» маркірує кольорова мітка. Кількість таких специфічних «сендвічів» визначає зміну оптичної щільності розчину, що корелює із титром антитіл.

Інколи, результат сумнівний, і попадає у сіру зону – це діапазон концентрацій специфічних антитіл, у який однаково можуть потрапляти як позитивні, і негативні проби. Результати аналізу, що потрапили до сірої зони, не можуть бути однозначно інтерпретовані, для уточнення результату необхідно повторити дослідження з новою сироваткою, отриманою через 1-2 тижні.

Імунохемілюмінісцентний (ІХЛА) метод при ідентифікації комплексу АГ+АТ використовує інший принцип детекції, який підвищує специфічності дослідження і якість результату.



Широке розповсюдження у пандемію Covid-19 отримали експрес методи, які також ґрунтуються на виявленні імунних комплексів АГ+АТ. Аналіз може виконуватися без спеціального обладнання із використанням капілярної крові (рис. 5.5).

Однак, вказані підходи мають не високу специфічність та чутливість (60-70%), і отриманий результат потребує уточнення.

Рис.5.5. Схема експрес тестування

Визначення стадії захворювання на підставі виявлення антитіл

Отримані результати клініцист співставляє із клінічною картиною, анамнезом захворювання та епідеміологічним станом. Як правило, за однократним вимірюванням титру антитіл, важко зробити клінічний висновок про стадію та перебіг інфекційного захворювання. Тому, вимірювання рекомендують аналізувати у динаміці. Час повторного дослідження визначає клініцист, ґрунтуючись на уявленні про активність процесу.

Підсумовуючи інформацію про методи дослідження в лабораторній імунології, можна пропонувати наступний діагностичний алгоритм (рис.5.6)



Рис.5.6. Діагностичний алгоритм

Клініцист, який замовляє дослідження, має пояснити пацієнту логіку діагностичного шляху та важливість дотримання правил збору матеріалу, чітко визначити послідовність процедури підготовки пацієнта до узяття проби.

Усі особливості збору матеріалу доцільно обговорити із спеціалістами лабораторії або використати інформацію.

Контрольні питання

1. Хто і на якій підставі робить запит до лабораторії для виконання дослідження? Які зони відповідальності при зверненні до лабораторії: клініциста, медсестри, лаборанта?
2. Які документи (дані) гарантують якість роботи лабораторії? Які обов'язки мають фахівці лабораторії? Чи може лікар-лаборант відмінити замовлення у лабораторію?
3. Які етапи має лабораторне дослідження? Що, де і ким виконується протягом кожного етапу? Як розподіляються долі похибок лабораторного дослідження, відносно порушень протягом кожного етапу?
4. Назвіть основні правила оформлення направлення біологічного матеріалу та надання інформації про пацієнта у лабораторію. Які правила призначення та виконання термінових аналізів.
 5. Які порушення преаналітичного етапу приводять до похибки лабораторного результату.
 6. Які правила і особливості узяття крові для виконання гематологічних досліджень за допомогою гематологічного аналізатору?
 7. Яка різниця між сироваткою і плазмою? Як отримувати вказані речовини, для яких лабораторних досліджень вони використовуються?
 8. Які є причини відхилення матеріалу для дослідження в лабораторії? Чому дефектний матеріал не можна використовувати у дослідженні? Які похибки можуть статися?
 9. Який біологічний матеріал використовують при дослідженні загальноклінічними методами в лабораторії, при цитологічному дослідженні, в лабораторній імунології та генетиці?
10. Які лабораторні маркери діагностики гострого запального процесу є популярними в клінічній практиці на даний час і чому?
11. Який механізм формування лейкоцитозу в периферичній крові? Як відбувається регуляція цього процесу? Яку роль мають нейтрофільні лейкоцити в забезпеченні антибактеріального захисту?
12. Яку діагностичну цінність має відтворення лейкоцитарної формули? Який принцип її підрахунку? Яку інформативність для клініциста має опис морфологічних змін клітин периферичної крові?

13. Який принцип оцінки клітин крові використовує гематологічний аналізатор? Як відтворюється апаратний цифровий та графічний звіт?
14. Які основні відмінності гемограми при вірусній та бактеріальній інфекції?
15. Які параметри та особливості еритроцитів описують та характеризують еритроцитарні параметри гемограми?
 16. Які фактори та умови забезпечують зберігання рідинного стану крові у судинах?
 17. Які існують фактори ризику спонтанного тромбоутворення у судині? Які групи хворих їх мають?
 18. Які етапи гемостазу виділяють при ушкодженні судини? Що є проміжними продуктами та результатом кожного етапу?
 19. Який принцип покладений у ідеологію лабораторних тестів гемостазу? Що визначають глобальні тести? Яку інформацію дають клініцисту уточнюючі тести гемостазу?
 20. Які тести відносять до скринінгових досліджень гемостазу? Як проводять лабораторний моніторинг пацієнтів, що приймають дезагрегантну та антикоагулянтну терапію?
21. Які лабораторні методи використовують при діагностиці інфекцій? Як відрізняються їх характеристики? Який матеріал вони досліджують?
22. Яку інформативність має діагностика, заснована на ПЛР-реал-тайм методиці? В чому полягає принцип метода? Які процедурні особливості узяття матеріалу?
23. Які переваги та обмеження при верифікації збудників має бактеріологічне дослідження?
24. Яка інформативність серологічних лабораторних методів, заснованих на імунологічній компліментарності біологічних речовин?
25. Які основні кроки розбудови діагностичного алгоритму інфекційних захворювань? Як змінюється алгоритм діагностики в залежності від стадії захворювання?

Літературні джерела

- Ann Van den Bruel, The triumph of medicine: how overdiagnosis is turning healthy people into patients, *Family Practice*, Volume 32, Issue 2, April 2015, Pages 127–128, <https://doi.org/10.1093/fampra/cmv008>
- Bamberg R, Akroyd D, Moore TM. Factors that impact clinical laboratory scientists' commitment to their work organizations. *Clin Lab Sci*. 2008 Summer;21(3):167-77. PMID: 18678139.
- Brian R. Smith, MD, Maria Aguero-Rosenfeld, MD, John Anastasi, MD, et al., Educating Medical Students in Laboratory Medicine: A Proposed Curriculum, *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 133, Issue 4, April 2010, Pages 533–542, <https://doi.org/10.1309/AJCPQCT94SFERLNI>
- Carter, Jane. Good clinical diagnostic practice: a guide for clinicians in developing countries to the clinical diagnosis of disease and to making proper use of clinical diagnostic services / by Jane Carter..... [et al.] .p. (WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean Series; 27)
- Chandra S, Chandra H, Kusum A, Singh Gaur D. Study of the Pre-Analytical Phase of an ISO 15189: 2012-Certified Cytopathology Laboratory: A 5-Year Institutional Experience. *Acta Cytol*. 2019;63(1):56-62. doi: 10.1159/000494567. Epub 2018 Dec 19. PMID: 30566946.
- Hailu HA, Yalew A, Desale A, Asrat H, Kebede S, Dejene D, et al. (2020) Physicians' satisfaction with clinical laboratory services at public hospitals in Ethiopia: A national survey. *PLoS ONE* 15(4): e0232178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232178>
- HANDBOOK for Good Clinical Lab https://sites.nationalacademies.org/cs/groups/pgasite/documents/webpage/pga_195327.pdf
- International Organization for Standardization ISO15189:2007 Medical laboratories – particular requirements for quality and competence [page on the Internet]. 2007.
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Infectious agents and how they cause disease. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27114/>
- Julie A. Hammerling, A Review of Medical Errors in Laboratory Diagnostics and Where We Are Today, *Laboratory Medicine*, Volume 43, Issue 2, February 2012, Pages 41–44, <https://doi.org/10.1309/LM6ER9WJR1IHQAUY>
- Karljin J. van Stralen, Vianda S. Stel, Johannes B. Reitsma, Friedo W. Dekker, Carmine Zoccali, Kitty J. Jager, Diagnostic methods I: sensitivity, specificity, and other measures of accuracy, *Kidney International*, Volume 75, Issue 12, 2009, Pages 1257-1263, ISSN 0085-2538, <https://doi.org/10.1038/ki.2009.92>.
- Lapić I, Padoan A, Bozzato D, Plebani M. Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein in Acute Inflammation. *Am J Clin Pathol*. 2020 Jan 1;153(1):14-29. doi: 10.1093/ajcp/aqz142. PMID: 31598629.
- Lippi, Giuseppe, Simundic, Ana-Maria and on behalf of the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE),. "The EFLM strategy for harmonization of the preanalytical phase" *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, vol. 56, no. 10, 2018, pp. 1660-1666. <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0277>
- Najat D. Prevalence of Pre-Analytical Errors in Clinical Chemistry Diagnostic Labs in Sulaimani City of Iraqi Kurdistan. *PLoS One*. 2017 Jan 20;12(1):e0170211. doi: 10.1371/journal.pone.0170211. PMID: 28107395; PMCID: PMC5249186.
- Patel S, Nanda R, Sahoo S, Mohapatra E. Congruity in Quality Indicators and Laboratory Performance. *Indian J Clin Biochem*. 2018 Jul;33(3):341-347. doi: 10.1007/s12291-017-0687-9. Epub 2017 Aug 5. PMID: 30072835; PMCID: PMC6052727.
- Rachna Agarwal, MD, Quality-Improvement Measures as Effective Ways of Preventing Laboratory Errors, *Laboratory Medicine*, Volume 45, Issue 2, May 2014, Pages e80–e88, <https://doi.org/10.1309/LMD0YIFPTOWZONAD>
- Saffar H, Saatchi M, Sadeghi A, Asadi Amoli F, Tavangar SM, Shirani F, Aliasgari A. Knowledge of Laboratory Medicine in Medical Students: Is It Sufficient? *Iran J Pathol*. 2020 Spring;15(2):61-65. doi: 10.30699/ijp.2020.94221.1916. Epub 2020 Apr 1. PMID: 32215020; PMCID: PMC7081764.
- Smith BR, Kamoun M, Hickner J. Laboratory Medicine Education at U.S. Medical Schools: A 2014 Status Report. *Acad Med*. 2016 Jan;91(1):107-12. doi: 10.1097/ACM.0000000000000817. PMID: 26200574; PMCID: PMC5480607.

- TimNiehues. C-reactive protein and other biomarkers—the sense and non-sense of using inflammation biomarkers for the diagnosis of severe bacterial infection. *LymphoSign Journal*. 5(2): 35-47. <https://doi.org/10.14785/lymphosign-2018-0001>
- Tuijn CJ, Msoka E, Mushi DL, Boer MS, Chilongola J, van den Broek A. The interface between clinicians and laboratory staff: A field study in northern Tanzania. *Afr J Lab Med*. 2014 Jul 23;3(1):126. doi: 10.4102/ajlm.v3i1.126. PMID: 29043178; PMCID: PMC5637763.
- van der Meer W, van Gelder W, de Keijzer R, Willems H. Does the band cell survive the 21st century? *Eur J Haematol*. 2006 Mar;76(3):251-4. doi: 10.1111/j.1600-0609.2005.00597.x. Epub 2006 Jan 12. PMID: 16412143.
- van Walraven C, Naylor CD. Do We Know What Inappropriate Laboratory Utilization Is? A Systematic Review of Laboratory Clinical Audits. *JAMA*. 1998;280(6):550–558. doi:10.1001/jama.280.6.550
- Лабораторная диагностика системы гемостаза / А.А.Козлов, Л.В.Натрус, П.А.Черновол, А.Л.Мелкумян и др.- М.: Литтерра. 2011.- 136 с.
- Луговская С.А. та ін. Лабораторная гематология.-М.: Тверь. 2006