

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Красноярский государственный медицинский
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Фармацевтический колледж

Дневник
учебной практики
по МДК 07.03 «Теория и практика лабораторных иммунологических
исследований»

Тамониной Ольги Вячеславовны

ФИО

Место прохождения практики

(медицинская организация, отделение)

с «30» марта 2020 г. по «5» апреля 2020 г.

Руководитель практики:

Ф.И.О. (его должность)

Красноярск, 2020 г.

Содержание

1. Цели и задачи практики
2. Знания, умения, практический опыт, которыми должен овладеть студент после прохождения практики
3. Тематический план
4. График прохождения практики
5. Инструктаж по технике безопасности
6. Содержание и объем проведенной работы
7. Манипуляционный лист (Лист лабораторных / химических исследований)
8. Отчет (цифровой, текстовой)

Цель учебной практики «Теория и практика лабораторных иммунологических исследований» состоит в закреплении и углублении теоретической подготовки обучающегося, приобретении им практических умений, формировании компетенций, составляющих содержание профессиональной деятельности медицинского технолога.

Задачи:

1. Ознакомление со структурой иммунологической лаборатории и организацией рабочего места медицинского технолога;
2. Проведение основных и дополнительных лабораторных исследований для дифференциальной диагностики заболеваний иммунной системы;
3. Проведение исследований на современном лабораторном оборудовании;
4. Обучение студентов оформлению медицинской документации;
5. Формирование основ социально-личностной компетенции путем приобретения студентом навыков межличностного общения с медицинским персоналом и пациентами; **Программа учебной практики.**

В результате прохождения практики студенты должны уметь самостоятельно:

1. Организовать рабочее место для проведения лабораторных исследований.
2. Подготовить лабораторную посуду, инструментарий и оборудование для анализов.
3. Приготовить растворы, реактивы, дезинфицирующие растворы.
4. Провести дезинфекцию биоматериала, отработанной посуды, стерилизацию инструментария и лабораторной посуды.
5. Провести прием, маркировку, регистрацию и хранение поступившего биоматериала.
6. Регистрировать проведенные исследования.
7. Вести учетно-отчетную документацию.
8. Пользоваться приборами в лаборатории.
9. Выполнять методики определения веществ согласно алгоритмам

**По окончании практики студент должен представить
в колледж следующие документы:**

1. Дневник с оценкой за практику, заверенный подписью общего руководителя и печатью ЛПУ.
2. Характеристику, заверенную подписью руководителя практики и печатью ЛПУ.

3. Текстовый отчет по практике (положительные и отрицательные стороны практики, предложения по улучшению подготовки в колледже, организации и проведению практики).
4. Выполненную самостоятельную работу.
5. Аттестационный лист.

В результате учебной практики обучающийся должен:

Приобрести практический опыт:

ПО. 2 Проведение основных и дополнительных лабораторных исследований для дифференциальной диагностики заболеваний органов кроветворения; **ПО. 3** Современные методы постановки оценки иммунного статуса;

Умения:

- У.7** дифференцировать патологические клетки крови при подсчете лейкоцитарной формулы;
- У.8** проводить контроль качества гематологических исследований;
- У.9** проводить основные и дополнительные методы оценки состояния клеточного и гуморального иммунитета;
- У.10** работать на современном медицинском и лабораторном оборудовании;
- У.11** проводить контроль качества иммунологических исследований;

Знания:

- З.13** роль и место клинической иммунологии в современной диагностической медицине;
- З.14** строение и функции иммунной системы;
- З.15** основные иммунопатологические процессы;
- З.16** принципы оценки клеточного и гуморального иммунитета, нарушений лимфо- и миелопоэза;
- З.17** основные признаки пролиферации, дисплазии, метаплазии, фоновых процессов;

Прохождение данной учебной практики направлено на формирование общих (ОК) и профессиональных (ПК) компетенций:

ПК 7.1. Готовить рабочее место и аппаратуру для проведения клинических лабораторных исследований.

ПК 7.2. Осуществлять высокотехнологичные клинические лабораторные исследования биологических материалов.

ПК 7.3. Проводить контроль качества высокотехнологичных клинических лабораторных исследований.

ПК 7.4. Дифференцировать результаты проведенных исследований с позиции «норма - патология».

ПК 7.5. Регистрировать результаты проведенных исследований.

ПК 7.6. Проводить утилизацию биологического материала, дезинфекцию и стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария, средств защиты.

- ОК 1 Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.
- ОК 2 Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.
- ОК 3 Принимать решения в стандартных и нестандартных ситуациях и нести за них ответственность.
- ОК 4 Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.
- ОК 5 Использовать информационно-коммуникационные технологии в профессиональной деятельности.
- ОК 6 Работать в коллективе и команде, эффективно общаться с коллегами, руководством, потребителями.
- ОК 7 Брать ответственность за работу членов команды (подчиненных), за результат выполнения заданий.
- ОК 8 Самостоятельно определять задачи профессионального и личностного развития, заниматься самообразованием, осознанно планировать повышение квалификации.
- ОК 9 Ориентироваться в условиях смены технологий в профессиональной деятельности.
- ОК 10 Бережно относиться к историческому наследию и культурным традициям народа, уважать социальные, культурные и религиозные различия.
- ОК 11 Быть готовым брать на себя нравственные обязательства по отношению к природе, обществу и человеку.
- ОК 12 Оказывать первую медицинскую помощь при неотложных состояниях.

- ОК 13 Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.
- ОК 14 Вести здоровый образ жизни, заниматься физической культурой и спортом для укрепления здоровья, достижения жизненных и профессиональных целей.

Тематический план

№	Наименование разделов и тем практики	Всего часов
8 семестр		36
1	<i>Ознакомление с правилами работы в КДЛ:</i> - изучение нормативных документов, регламентирующих санитарно-противоэпидемический режим в КДЛ	2
2	<i>Организация рабочего места:</i> - приготовление реактивов, подготовка оборудования, посуды для исследования	3
3	<i>Определение иммунологических показателей:</i> -клеточного звена -гуморального звена - систему комплемента	24
4	<i>Регистрация результатов исследования</i>	2
5	<i>Выполнение мер санитарно-эпидемиологического режима:</i> - проведение мероприятий по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты; - утилизация отработанного материала.	4
Вид промежуточной аттестации		
Зачет		1
Итого		36

График прохождения практики

№ п/п	Дата	Часы	Оценка	Подпись руководителя
1	30.03.20	С 8:00 до 14:00		
2	01.04.20	с 8:00 до 14:00		
3	02.04.20	с 8:00 до 14:00		
4	03.04.20	с 8:00 до 14:00		
5	04.04.20	с 8:00 до 14:00		
6	05.04.20	с 8:00 до 14:00		

30.03.2020

День 1

1. Список нормативных документов, определяющих сан. эпид.

режим в работе иммунологической лаборатории:

- a. Приказ МЗ СССР от 03.09.91 № 254. О развитии дезинфекционного дела в стране;
- b. ОСТ 42-31-2-85. Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения;
- c. Приказ МЗ РФ от 12.07.98 № 408. Дезинфекция, предстерилизационная очистка и стерилизация изделий медицинского назначения для профилактики вирусных гепатитов;
- d. Приказ МЗ РФ от 25.12.97 №380. О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях Здравоохранения РФ;
- e. Приказ МЗ РФ от 05.10.95 № 280/80. Об утверждении временных перечней вредных, опасных веществ и производственных факторов, а также работ, при выполнении которых проводятся предварительные и периодические медицинские осмотры работников;
- f. Приказ МЗ РФ от 25.09.95 №143/270. О создании технического комитета по клиническим лабораторным исследованиям и диагностическим тест системам invitro;
- g. Приказ МЗ РФ № 170 от 16.08.94г. «О мерах по совершенствованию профилактики и лечения ВИЧ- инфекции в Российской Федерации»;
- h. СанПиН 2.1.7.2790 -10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»;

2. Утилизация отходов различных классов, преимущество и недостатки методов утилизации:

Класс опасности	Утилизация
Класс А (эпидем. безопасн. отходы, по составу)	Поскольку отходы данного класса не являются потенциально опасными, допускается складировать на обыкновенных полигонах ТБО либо сбрасывать в канализацию
Класс Б (эпидем. опасные отходы)	Правила обеззараживания медицинских отходов данного класса таковы, что, для данного типа отходов требуется обеззараживание, после которого они могут сжигаться либо захораниваться
Класс В (чрезвыч. эпидем. опасные отходы)	При окончательной упаковке медицинских отходов класса В с целью удаления их из учреждения, пакеты и баки маркируются «Отходы Класс В» и на них наносится название организации, подразделения, текущей даты и фамилии лица, ответственного за сбор отходов
Класс Г (токсикол. опасные отходы 1-4 классов опасности)	Вывоз отходов данного класса для обезвреживания или утилизации должен осуществляться специализированными организациями, которые имеют лицензию на подобный вид деятельности
Класс Д (радиоактивные отходы)	Утилизируются в соответствии с основными санитарными правилами обеспечения радиационной безопасности и нормами радиационной безопасности

Методы утилизации	Преимущества	Недостатки
Сжигание	Применимо для острых инфицированных, токсичных, фармацевтических отходов, цитостатиков; подходит для большого количества отходов; сокращение объема и веса отходов; эффективное обеззараживание;	Метод устаревший, опасный, загрязняет атмосферу. Зола, образовавшаяся после сжигания, отправляется на специальные полигоны

Пиролиз	Разложение органики, входящей в состав отходов. Полученная смесь проходит процедуру дожига. Токсичность уменьшается или исчезает полностью. Метод исключает выброс токсинов в атмосферу	Неприменимо для фармацевтических, химических, острых отходов, неполное разрушение цитостатиков
Плазменные технологии	Утилизация происходит в плазменных установках. Метод не применяется, находится в разработке	Находится в разработке
Химическая утилизация	Применимо для острых и инфекционных отходов	Обработка химическим веществом. Метод опасен. Результатом может стать токсичный отход.
Термохимическая утилизация	Метод, сочетает в себе измельчение, нагревание и дезинфекцию отходов. Подходит для веществ классов Б и В	Отсутствует
Стерилизация	Дезинфекция в паровой установке. Измельчает и обеззараживает отходы.	Отсутствует
Автоклавирование	Применимо для острых и инфицированных отходов; эффективное обеззараживание.	Неприменима для анатомических, фармацевтических, химических и цитотоксических, термостойких отходов; нужно измельчение для потери товарного вида; наличие неприятных запахов; ограниченная мощность; требуется

		система очистки газодымовых выбросов;
--	--	--

3. Схема организации иммунологической лаборатории:

"Чистая зона"	"Грязная зона"	"Рабочая зона"
• Кабинет заведующей • Помещение для работы с документами • Материальная • Помещение для приема пищи • Гардероб • Туалет • Склад химических реактивов	• Помещение приема и регистрации материала • Пробоподготовка • Моечная • Утилизация	• Вошер • Шейкер • Ридер • Иммунологические анализаторы (открытого и закрытого типа)

4. Вакутейнеры, для иммунологических исследований:

Пробирки вакуумные с активатором свертывания крови, цвет крышки – красный:

- Время свертывания крови 10-30 мин;
- Применение: клиническая химия, **иммунология**;
- Материал для исследования: сыворотка;
- Действия: 5-8 раз аккуратно перевернуть непосредственно после взятия крови, центрифугировать через полчаса;
- Параметр центрифугирования: 2000g / 5 мин.

Пробирки вакуумные с активатором свертывания крови и разделительным гелем, цвет крышки – желтый:

- Применение: клиническая химия, **иммунология**;
- Материал для исследования: сыворотка;

с. Действия: 5-8 раз аккуратно перевернуть непосредственно после взятия крови, центрифугировать через полчаса;

d. Параметр центрифугирования: 2000g / 5 мин.

Пробирки вакуумные с гепарином, цвет крышки – зеленый:

a. Применение: клиническая химия, иммунология, гематология;

b. Материал для исследования: плазма;

с. Действия: 8-10 раз аккуратно перевернуть непосредственно после взятия крови;

d. Параметр центрифугирования: 2000g / 5 мин.

31.03.2020

День 2.

1. Таблица методов исследования в иммунологической лаборатории:

Метод исследования	Принцип метода	Преимущества	Недостатки
ИФА	Лабораторный иммунологический метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса «антиген-антитело» за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску. Основой проведения любого варианта ИФА служит определение продуктов ферментативных реакций при исследовании тестируемых образцов в сравнении с негативными и позитивными контролями	Высокий уровень специфичности и чувствительности с простотой и быстротой постановки анализа. Это обуславливает их применение на любом этапе оказания медицинской помощи, начиная с первичного звена здравоохранения. Тесты сконструированы на основе высокоочищенных видоспецифических антигенов, благодаря чему удается избежать перекрестных реакций при обнаружении антител к соответствующему возбудителю и диагностировать заболевания на ранней стадии. Ранняя диагностика инфекции позволяет назначить своевременное адекватное лечение. Методика не требует дополнительного оборудования	К сожалению, для проведения ИФА нужно знать, что именно искать: методика анализа подразумевает, что врач заранее имеет предположение о природе заболевания. Поэтому нет смысла назначать такой тест в надежде случайно «угадать» диагноз. В случае диагностики инфекционных заболеваний иммуноферментный анализ не может найти возбудителя и определить его специфичные свойства: он лишь указывает на наличие антител в крови у больного, косвенно свидетельствующих о присутствии чужеродного микроорганизма в теле человека. ИФА — крайне точный, но не дешевый метод, поэтому обращаться к нему нужно с умом, а интерпретацией результатов должен заниматься квалифицированный врач

Проточная цитометрия	Принцип метода проточной цитометрии основан на регистрации флюоресценции и светорассеяния от каждой отдельно взятой клетки в клеточной суспензии. Суспензия клеток под давлением подается в проточную ячейку, где за счет разности давлений между образцом и обтекающей жидкостью клетки, находясь в ламинарном потоке жидкости, выстраиваются в цепочку друг за другом (т.н. гидродинамическое фокусирование)	Теоретические возможности ПЦ на сегодняшний день поддерживаны многопрофильным программным обеспечением проточных цитометров. Метод проточной цитометрии на сегодняшний день является «золотым стандартом» клинικο-лабораторного исследования в иммунологии	Сложное оборудование, трудности пробоподготовки и интерпретации результатов
Метод розеткообразования	Тимуснезависимые В-лимфоциты имеют на своей мембране специфические детерминанты, позволяющие дифференцировать их от Т-лимфоцитов. Таким детерминантом является поверхностный (мембранный) иммуноглобулин класса М. Число лимфоцитов, несущих иммуноглобулин А, G, Е или D, крайне незначительно (А — 1—5 %, D и Е — 2—4 %), рецепторы для Fc-фрагмента иммуноглобулина G для третьего компонента комплемента (C3). Выделяют и другие специфические рецепторы, в частности для вируса Эпштейна—Барр, плазмноклеточный антиген, антиген Ia. Однако последние не нашли еще отражения в клинической практике. Чаще применяется метод выявления В-клеток по их способности образовывать розетки с бараньими эритроцитами, нагруженными антителами в	Низкая себестоимость	Имеет очень высокий коэффициент погрешности, достигающий 30%, по сравнению с методом проточной цитометрии

	среде комплемента. Такие эритроциты маркируют и Fc, и C3 рецепторы В-лимфоцитов		
Иммунохроматографический анализ	Основан на принципе тонкослойной хроматографии и включает реакцию в биологических материалах между антигеном и соответствующем ему антителом. Проводится анализ с помощью специальных тест-полосок, панелей или тест-кассет	Простота и удобство — позволяет получить результат без оборудования и специальных навыков. Надежность достоверность тестов достигает 92 – 99,8%, при этом каждый тест имеет встроенный внутренний контроль. Экономичность минимальные затраты на приобретение теста и экономия времени на проведение обследования	Однако иммунохроматографические тест-полоски не лишены недостатков. Касается это надежности, чувствительности и экономичности тестов. Надежность и чувствительность зависит, во-первых, от качества используемых в тесте моноклональных антител и, во-вторых, от концентрации антигена в биоматериале. Качество моноклональных антител зависит от способов их получения, очистки и фиксации на носителе. Концентрация антигена — от стадии заболевания и количества биоматериала. Количество биоматериала особенно важно при использовании цельной крови. При этом существенную роль играет гематокрит, т. е. соотношение плазмы и форменных элементов. При высоком гематокрите снижается количество плазмы с антигеном, мигрирующей вдоль полоски. Температура, от которой зависит скорость взаимодействия антитела с антигеном, важна только для времени постановки теста. Понятно, что использовать полоски при температуре ниже точки замерзания воды, составляющей основную часть биоматериала, не имеет смысла. Вызывает большие сомнения экономичность использования экспресс-тестов в бюджетных медицинских организациях, которые занимаются массовой диспансеризацией населения и которым как раз удобны и необходимы комплексные стрип-системы из тест-полосок для

			выявления различных заболеваний. Обусловлено это низкой стоимостью анализа по бюджетным расценкам. При этом себестоимость тест-полоски в некоторых случаях в 10 раз превосходит оплату анализа
Реакция латекс-агглютинации	Механизм РАЛ аналогичен РИГА, в которой используют сенсibilизированные антигенами или антителами эритроциты человека или животных. Для постановки РАЛ применяют сенсibilизированные частицы полистирольного латекса, которые в присутствии гомологичного реагента склеиваются. Обычно эта реакция проходит очень быстро (3...8 мин), что позволяет применить ее в качестве экспресс-метода для выявления антигенов и антител	Экспресс-метод для выявления антигенов и антител	Разработана давно, однако она не нашла достаточно широкого применения в медицине
Иммуноблотт инг	Антигены возбудителя разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносят их из геля на активированную бумагу или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью ИФА. Фирмы выпускают такие полоски с "блота́ми" антигенов*. На эти полоски наносят сыворотку больного. Затем, после инкубации, отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом. Образовавшийся на полоске комплекс [антиген +	Высокочувствительны й метод	Иммуноблот используют специальные лаборатории центров по борьбе со СПИДом. Пробы крови направляются туда для перепроверки уже положительных первичных скрининговых анализов. Сразу сдать его не получится, даже в платных клиниках

	антитело больного + антитело против Ig человека] выявляют добавлением хромогенного субстрата, изменяющего окраску под действием фермента		
ПЦР	Тест способен находить генетический материал ВИЧ (ДНК/РНК), то есть проверяет, есть ли непосредственно вирус в крови. Нуклеиновые кислоты могут обнаруживаться уже на 7-й день после инфицирования (по данным CDC — с 10 по 33 день). При этом методе в пробирке с помощью различных ферментов многократно дублируется участок ДНК или РНК вируса до таких объемов, что его можно увидеть глазом в виде полосок	ПЦР, можно сдать в любой момент, но только обратившись в коммерческую лабораторию. В СПИД-центрах его делают также для перепроверки ранее положительного теста. ПЦР позволяет максимально быстро (в течение 7—10 дней после инфицирования) обнаружить ВИЧ	Высокая стоимость; Может обнаружить только ВИЧ-1; В редких случаях выявление низких уровней РНК ВИЧ может привести к ложноположительному результату
Реакция иммунофлюоресценции	Основан на визуальном учете специфического взаимодействия флуорисцирующих специфических антител с гомологичным антигеном. Образующийся при этом, комплекс антиген-антитело, меченный флуорохромом, легко обнаружить по характерному свечению в сине-фиолетовых лучах люминесцентного микроскопа	Высокая специфичность и чувствительность; простота техники постановки; требуется минимальное количество компонентов. Это экспресс-метод диагностики, так как в течение нескольких часов можно получить ответ	К недостаткам можно отнести субъективизм в оценке интенсивности свечения и, к сожалению, иногда флуоресцирующие сыворотки бывают плохого качества

2. Описание преаналитического этапа, указание документов (приказы Мин.здрава), регламентирующие требования к преаналитическому этапу:

Первый шаг при инициации лабораторного обследования пациента – формирование направления. Бланк-направление в лабораторию для

проведения исследований должен содержать информацию о пациенте (Ф. И. О., пол, возраст, домашний адрес, номер страхового полиса), об источнике получения крови (тип образца: венозная, артериальная, капиллярная). Необходимо также указать дату и время взятия крови и, конечно, перечень необходимых исследований.

Источник получения крови (как и возраст) определяет соответствующие референтные значения. Например, существуют различия между концентрацией глюкозы капиллярной и венозной крови. Капиллярная кровь – среда, содержащая интерстициальную жидкость и артериальную кровь, поэтому концентрация глюкозы в капиллярной крови (в среднем 5,4 ммоль/л) выше, чем в венозной (в среднем 4,1 ммоль/л).

Маркировка времени взятия крови на бланке позволяет оценить сохранность компонентов пробы крови до исследования. Наряду с традиционным периодом доставки крови, в течение часа после получения пробы, есть ряд исследований, которые необходимо выполнить в течение 10 мин после взятия крови. Для подобных исследований бланк-направление в лабораторию может иметь специальную пометку и указание способа доставки (вакуумная почта, например) и условий сохранности содержимого пробы.

Например, пробы для исследования гемостаза, наиболее чувствительные к условиям хранения, должна доставлять в лабораторию медицинская сестра клинического отделения.

Дополнительно можно предусмотреть предварительное центрифугирование пробы (в случае использования пробирок с разделительным гелем). Это обеспечит последующую сохранность содержимого сыворотки или плазмы до 48 ч при необходимости длительной транспортировки.

Последний момент – перечень необходимых исследований. Врач, направивший больного на обследование с рукописным бланком, может упустить необходимые и желаемые исследования. Использование лабораторной информационной системы упрощает заполнение бланка, позволяя сделать выбор из списка. Кроме того, по результатам считывания штрихкода в направлении можно получить всю информацию, заключенную в бланке, как о пациенте, так и о направившем его враче.

ГОСТ Р 53079.3-2008 Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Национальный стандарт РФ. Часть 3.

ГОСТ Р 53079.4-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа.

ГОСТ Р ИСО 15189-2009 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.

01.04.2020

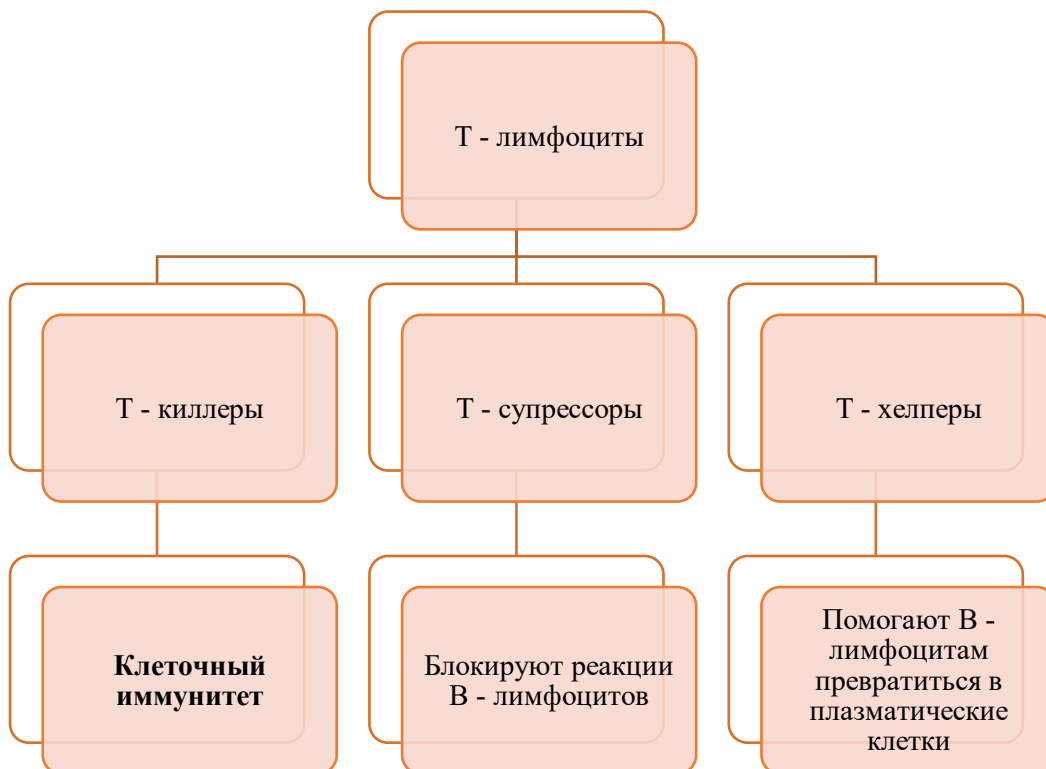
День 3

Оценка клеточного звена: Для определения антигенспецифичных Т-клеток часто используют тест стимуляции лимфоцитов – пролиферативный ответ Т-клеток на антиген, выявляемый по включению ими ³H-тимидина

Цитотоксическую активность клеточных популяций определяют по их способности лизировать клетки-мишени. Количественно лизис клеток-мишеней определяют при помощи теста с высвобождением меченого хрома.

Для определения Th1- и Th2-лимфоцитов требуются предварительное культивирование в присутствии ИЛ-2 (12-15 сут) и клонирование пролиферических клеток. Далее клетки определяют цитофлуориметрически с помощью моноклональных антител к ключевым цитокинам (γ ИФН и ИЛ-4), выявляя эти цитокины в цитоплазме клеток.

Механизм клеточного иммунитета:



Обычно при неясной клинической картине и неспецифических симптомах назначается комплексное исследование иммунитета, включающее оценку:

- содержания в крови клеток иммунной системы с различными функциями;
- активности иммунных клеток;
- способности клеток поглощать бактерии и синтезировать антитела.

1. Исследования, назначенные в районных поликлиниках: общий анализ крови, проведенный «ручным» методом, кожные тесты для диагностики гиперчувствительности замедленного типа, тестирование на ВИЧ;

2. Исследования, назначенные лаборатория при стационарах: абсолютное количество лимфоцитов, тестирование на ВИЧ,

3. Исследования, назначенные в специализированных лабораториях: определение субпопуляций (CD3+/CD4+/CD8+) лимфоцитов; (CD3+/CD4+/CD8+/CD16+/CD19+) лимфоцитов.

02.04.2020

День 4

Районные поликлиники:	Лаборатории при стационарах:	Специализированные лаборатории:
• ОАК проведенный «ручным» методом; • Кожные тесты для диагностики гиперчувствительности замедленного типа; • Тестирование на ВИЧ и RW	• ОАК; • Группа крови; • Резус-фактор; • Гепатиты В и С; • ВИЧ-инфекция и RW	• Уровни IgG, IgM, IgA и IgE; • Титры изогемагглютининов; • Выработка антител в ответ на вакцинный антиген; • Фенотипирование и количество В-клеток методом проточной цитометрии и моноклональные антитела к В-клеткам; • Проточная цитометрия для CD40 и лиганда CD40; • Определение мутаций в генах, кодирующих БТК и NEMO; • Потовый тест

Причинами назначения анализа могут стать:

- ✓ плохое самочувствие;
- ✓ утомляемость;
- ✓ частые простудные заболевания;
- ✓ частые обострения хронических заболеваний

Обычно при неясной клинической картине и неспецифических симптомах (к ним относятся и перечисленные выше) назначается комплексное исследование иммунитета, включающее оценку:

- ✓ содержания в крови клеток иммунной системы с различными функциями;
- ✓ активности иммунных клеток;
- ✓ способности клеток поглощать бактерии и синтезировать антитела

03.04.2020

День 5

Методы	Принципы	Преимущества	Недостатки	Референтные границы
Методы исследования системы комплемента				
Определение общей гемолитической активности классического пути	Сыворотку крови разводят физиологическим раствором 1:10 и вносят в пробирки в объеме от 0,05 до 0,5 мл. Объем проб доводят до 1,5 мл физиологическим раствором и вносят по 1,5 мл гемолитической системы (смесь равных объемов 3% взвесей бараньих эритроцитов и гемолитической сыворотки). Пробирки инкубируют при 37°C 45 минут, - охлаждают при 4°C для остановки реакции и центрифугируют при 1500 оборотов 4-5 минут. После центрифугирования определяют объем сыворотки, вызывающий лизис 50% сенсibilизированных эритроцитов (условную гемолитическую единицу активности комплемента - СН 50), затем рассчитывают количество СН 50 на мл цельной сыворотки. Гемолитическую активность альтернативного пути комплемента определяют также, но вместо сенсibilизированных бараньих эритроцитов используют несенсibilизированные кроличьи эритроциты и физиологический раствор, содержащий ионы Mg, но без Са для блокирования классического пути активации.	Метод позволяет исключить или подтвердить функциональные нарушения системы комплемента и является скрининговым; оценивает активность исключительно классического пути активации комплемента.	Менее точный и менее чувствительный метод; является косвенной оценкой образования мембраноатакующих комплексов, разрушающих эритроциты.	42 - 129 у.е./мл. Снижение СН50 наблюдается обычно при дефиците или повышенном потреблении отдельных компонентов классического пути активации комплемента.

Определение функциональной активности отдельных компонентов	Этот метод позволяет определить численность функционально активных молекул в 1 мл сыворотки крови. Для этого к сенсibilизированным эритроцитам добавляют реагент на определенный компонент комплемента (в качестве реагента используют либо смесь компонентов комплемента, исключая искомый, либо сыворотку крови, лишенную активности этого компонента. Сыворотку для титрования компонентов классического пути разводят в 40-50 -раз, а альтернативного - в 5-7 раз.	Установка дефектов определенных компонентов и определение профиля комплемента при различных заболеваниях. При этом в реакции измеряются и классическая активация, и терминальные компоненты комплемента.	Неодновременность функциональной активности отдельных компонентов иммунитета.	
Иммунохимическое определение концентрации компонента в комплемента	Данный метод исследования позволяет определить концентрацию каждого из белков комплемента, используя антисыворотки (антитела) к ним. Концентрация белков выражается в г/л. Для определения используют метод радиальной иммунодиффузии в агаре.	Быстрота и простота определения; возможность автоматизации и использования для массовых анализов в полевых условиях; не сложная пробоподготовка; высокая точность; не требуется дорогостоящей аппаратуры	Узкая специфичность и влияние компонентов матрицы.	Концентрация C3-компонента у здоровых людей в сыворотке составляет 0,50 - 1,20 г/л. Концентрация C4 в сыворотке 0,2 - 0,5 г/л.
Определение активности комплемента и его компонента в методом радиального гемолиза в агаровом геле	Гемолитическую систему смешивают с расплавленным агаром в соотношении 1:7 и быстро выливают в стерильные чашки Петри. После застывания в агаре проделывают лунки диаметром 4.мм- (до 15 лунок на 1-ой чашке). Лунки заполняются испытуемыми сыворотками и помещают чашки в холодильник при 4°C	Отсутствие чувствительности метода к воздействию сывороточных ингибиторов гемагглютинации, что позволяет отказаться от предварительной обработки	На результаты влияют методические особенности ее постановки и качество агарозы.	Смотрят по лункам зонам гемолиза.

	на 21 час для диффузии белков комплемента в агар. Затем чашки помещают в термостат на 60 минут для проявления зон гемолиза. Критерием активности комплемента служит квадрат диаметра зон гемолиза.	исследуемых сывороток и использовать в реакции свежевыделенные ингибиторочувствительные штаммы. Кроме того, тест позволяет исследовать неразведенные сыворотки.		
Методы исследования фагоцитарного звена иммунитета				
Прямой метод	- Смесь дрожжей с гепаринизированной кровью. Мазок на предметном стекле. - Подсчет количества ФН из 100 клеток и кол-во поглощенных ими объектов. Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов осуществляется по трем показателям. <u>ФП</u> (фагоцитарный показатель) – число фагоцитирующих нейтрофилов на 100 подсчитанных нейтрофилов через 30 минут инкубации. <u>ФЧ</u> (фагоцитарное число) определяется путем деления количества поглощенных дрожжевых клеток на число «активных» (поглотивших дрожжи) нейтрофилов через 30 минут инкубации, что соответствует среднему числу дрожжевых клеток, поглощенных одним активным нейтрофилом. КАФ (коэффициент активных фагоцитов) – интегральный показатель активности фагоцитарной системы, выражающийся в абсолютном количестве фагоцитирующих нейтрофилов, рассчитывается, исходя из	Не требуется дорогостоящей аппаратуры.	Имеет значение в комплексном анализе и диагностике иммунодефицита состояний.	1. Фагоцитарный индекс: через 30 мин - $94,2 \pm 1,5$, через 120 мин - $92,0 \pm 2,5$ 2. Фагоцитарный показатель : через 30 мин $11,3 \pm 1,0$, через 120 мин - $9,8 \pm 1,0$ 3. Индекс завершенности фагоцитоза : $66,3 \pm 2,6$

	общего количества лейкоцитов, % содержания нейтрофилов и ФП.			
НСТ-тест	Бактерицидные кислородзависимые системы нейтрофильных гранулоцитов • полярографический метод (потребление кислорода) • НСТ-тест (восстановление нитросинего тетразолия) • йодирование (переход радиоактивного меченого йода в кислотонерастворимый осадок) • окисление глюкозы (образование молекул $^{14}\text{CO}_2$ при окислении глюкозы-^{14}C)	Отражает итоговую реакцию одной из основных ферментных систем, отвечающих за бактерицидность полиморфноядерных лейкоцитов.	Автоматизированные варианты фотометрического НСТ-теста имеют недостатки и не апробированы в клинической практике.	НСТ-тест (спонтанный тест): Дети 0-12 мес — 5 - 28 % Дети (1-7 лет) — 5 - 22 % Дети (7-15 лет) — 5 - 19 % Взрослые (от 15 лет) — 5 - 18% Нейтрофильный фагоцитоз (стимулированный тест): 40 - 82%
Проточная цитофлуориметрия	Определяет: процент фагоцитирующих НГ; среднюю интенсивность флюоресценции	Быстрота; объективность; высокая пропускная способность.	Сложность технического оборудования и необходимость специальной подготовки пробы.	
Хемилюминесценция	Регистрация собственной ХЛ; ХЛ в присутствии люминола	Можно определить соотношение «антиген-антитело», то есть увидеть количество антител, реагирующих на различные раздражители	Дороговизна метода.	

Задача: Больной 34 года, направлен на прием по поводу диареи в течение двух месяцев. Из анамнеза: в течение трех месяцев работал в командировке, где было нарушение питания, за медицинской помощью не обращался.

Анализ крови: выраженная анемия–Hb 74-79г/л; п/я сдвиг до миелоцитов, токсическая зернистость нейтрофилов, СОЭ – 40 – 62 мм/час;

Иммунограмма: CD4 – 30 кл, ВН – 4501 коп/мл.

Предположительно: Вторичный иммунодефицит