

KMSZTS

ZBIRKA PITANJA I ODGOVORA ZA LICENCNI ISPIT ZA PROFIL LABORATORIJSKI TEHNIČAR

KMECUTS

BEOGRAD, 14.03.2016.

II PROFIL: LABORATORIJSKI TEHNIČAR

Pitanja pripremila : Tanja Stamatović

1. Šta je laboratorijski protokol?

Laboratorijski protokol je matični i najvažniji zvanični dokument u laboratoriji. U protokolu se registruju svi potrebni podaci o pacijentu, biološkim uzorcima, kao i o rezultatima određivanja. Različitog su obima i sadržaja u zavisnosti od laboratorije i zdavstvene ustanove.

2. Šta su krvne grupe?

Krvne grupe su nasledne biološke karakteristike koje se sastoje od antiga koji su smešteni na membrani eritrocita i antitela koja se nalaze u serumu tj. plazmi.

3. Šta je hemoliza i šta ne sme da se radi iz hemoliziranog uzorka?

Hemoliza je proces izlaska sastojaka krvnih ćelija u plazmu i serum (hemo-krv, lysis-razbiti, otvoriti). Usled hemolize dolazi do povećanja koncentracije svih parametara koji se u eritrocitima nalaze u većim koncentracijama nego u plazmi (LDH, Kalijum, AST, ALT, CK, CK-MB, Kisela fosfataza, Magnezijum, PT, PTT).

4. Koja je uloga antikoagulanasa i koji antikoagulansi se koriste u hematologiji i hemostazi?

Antikoagulansi treba da spreče koagulaciju izvađene krvi. Zavisno od vrste ispitivanja koriste se različiti antikoagulansi.

EDTA (Etilendiamino-tetrasirćetna kiselina), Natrijum citrat, Heparin.

EDTA (Etilendiamino-tetrasirćetna kiselina)- Natrijumove i kalijumove soli EDTA su snažni antikoagulansi pogodni za hematološka ispitivanja. U praksi se uglavnom koriste EDTA-Na₂, EDTA-K₂ (za određivanje KKS), EDTA-K₃. EDTA deluje antikoagulantno, tako što stvara helat sa jonima kalcijuma u krvi.

Natrijum citrat- Se koristi za određivanje faktora koagulacije i sedimentacije. Za testove hemostaze se koristi odnos 9 delova krvi sa jednim delom natrijum citrata, i odmah se dobro promeša. Za određivanje sedimentacije četiri dela krvi pomeša sa jednim delom citrata. Za duže

čuvanje eritrocita preporučuje se rastvor ACD (acidum-citicum u kombinaciji sa dekstrozom) i CPD (citrat-fosfat-dekstroza rastvor).

Heparin- Antikoagulantni efekat heparin ostvaruje direktnim dejstvom na trombin, inhibirajući interakciju pojedinih faktora koagulacije u prisustvu trombina III (agregacija trombocita).

5. Kojim metodama se određuju krvne grupe ABO/ Rh krvno grupnog sistema?

Krvne grupe ABO/ Rh se određuju: metodom u epruveti, metodom na pločici, metodom u gelu, metodom u mikrotatarskim pločama, metodom PCR ...

6. Koja su obavezna testiranja svake uzete jedinice krvi od dobrovoljnih davalaca krvi?

Obavezni testovi koji se obavljaju nakon svakog dobrovoljnog davanja krvi bez obzira na broj davanja su: određivanje krvne grupe ABO i Rh sistema, test skrininga iregularnih eritrocitnih antitela, testiranje na markere transfuzijom prenosivih bolesti (HIV Ag/At, HBs Ag, HCV At, Sifilis).

7. Koji testovi obuhvataju pretransfuziona testiranja?

Pretransfuziona testiranja obuhvataju:

- Određivanje krvne grupe ABO/ Rh,
- DAT (direktan antiglobulinski test),
- Test interreakcije
- Test scrininga antitela
- Test identifikacije antitela
- Test tipizacije eritrocitnih antigena.

8. Šta podrazumeva preanalitička faza u biohemijskoj laboratoriji?

Preanalitička faza podrazumeva izbor ispitivanja, pripremu pacijenta (unošenje hrane, stres, trudnoća, upotreba lekova, bez većih fizičkih aktivnosti, bez alkohola, vađenje krvi 12 sati posle zadnjeg obroka, vađenje krvi uvek u isto vreme 07-08h), način uzimanje uzorka krvi (postupci moraju biti standardizovani zbog mogućnosti grešaka koje nastaju pri samom vađenju krvi. Standardizacija postupaka za vađenje krvi obuhvata sve kriterijume za pravilno vađenje uzoraka krvi- prostor, oprema, pribor za vađenje krvi. Zbog nestručnog vađenja krvi nastaju hematomi, hemoliza i hemokoncentracija uzorka koja nastaje nastaje usled dužeg držanja poveske, što se direktno odražava na kvalitet analiza), identifikacija pacijenta, obeležavanje uzorka, transport, upisivanje u protokol laboratorije, priprema reagenasa, centrifugiranje, pravilno čuvanje uzoraka do izvođenja testova.

9. Šta podrazumeva analitička faza u biohemijskoj laboratoriji

Analitička faza podrazumeva analitiči rad, određivanje koncentracije. Priprema laboratorijskog stakla i aparata, pipetiranje: analitički uzorak i reagens, homogenizacija uzorka i reagenasa, inkubacija, merenje, izračunavanje koncentracije. Kontrola kvaliteta rada u laboratorijama treba da obezbedi pouzdanost laboratorijskih testova. Kontrola se sprovodi kroz sistem spoljašnje i unutrašnje kontrole. **Unutrašnja kontrola** se sastoji u praćenju različitih aspekata, procedura koje se izvode u laboratoriji. To obuhvata testiranje preciznosti rada, statističku analizu, kontrolu iz dana u dan. Unutrašnja kontrola treba da obezbedi kontinuiranu evaluaciju pouzdanosti rada u laboratoriji i primeni kontrolnih uzoraka. **Spoljašnja kontrola** sprovodi se kontrolnim materijalom koji laboratorija dobija od institucije koja se bavi spoljašnjom kontrolom, organizovana kao nacionalna, regionalna ili međunarodna. Sprovodenjem kontrole postiže se preciznost i tačnost. **Tačnost** predstavlja približavanje slaganja između srednje vrednosti i prave vrednosti kontrolnog materijala. Tačnost se određuje upotrebom kontrolnog materijala, različitim metodama poznate preciznosti. **Preciznost** predstavlja reproducibilnost rezultata, tj. približavanje slaganja između merenja i izražava se standardnom devijacijom. Netačnost ili nepreciznost rezultat je upotrebe neodgovarajućih standarda ili reagenasa, loše kalibracije ili neodgovarajuće metode. U biohemijskim laboratorijama se kao referentni materijali koriste kalibratori i kontrolni serumi. **Kalibratori** se koriste za kalibraciju analitičkih instrumenata i imaju tačno određenu vrednost parametara čije se koncentracije određuju. **Kontrolni serumi** se koriste za procenu preciznosti i tačnosti rezultata. Analiziraju se na potpuno isti način kao i uzorci pacijenata, a koncentracija parametara u kontrolnim serumima mora biti poznata. Kontrolni serumi se ne koriste za kalibraciju instrumenata.

10. Sta je biološki a šta analitički uzorak?

Biološki uzorak je deo biološkog sistema upućen u laboratoriju na obradu.

Analitički uzorak je deo biološkog uzorka, tačno definisanog volumena, u kome se određuje koncentracija jedne komponente, odnosno parametra.

Biološki uzorak se mora **pravilno** uzeti. Uzorak se mora uzeti **u hemijski čistu posudu**, mora se čuvati na odgovarajući način i pravilno transportovati do laboratorije. **Ispravan uzorak** je jedan od uslova da laboratorijski rezultati budu tačni.

11. Šta podrazumevamo pod kompletном krvnom slikom (KKS)?

Pod **KKS** podrazumevamo određivanje broja eritrocita, određivanje broja leukocita, određivanje hematokrita, određivanje koncentracije hemoglobina, određivanje broja trombocita.

12. Eritrociti (Er)- broj, oblik, građa, hemijski sastav, uloga, metode određivanja

Broj Er zavisi od pola i starosti. Muškarci $4,5-6,5 \times 10^{12}/l$, Žene $3,8-4,5 \times 10^{12}/l$, novorođenčad $4,0-5,6 \times 10^{12}/l$, ali odmah po rođenju nastaje razgradnja suvišnih eritrocita. Oblika su bikonkavnog diska, na preseku oblik piškote. Eritrociti imaju membranu i citoplazmu. Membrana je propustljiva za O₂, CO₂, glukozu, vodu, azot i ureu. Citoplazma-stroma zrelih Er ima mrežastu strukturu u čijim se okcima nalazi hemoglobin. U citoplazmi mlađih Er-retikulocita nalaze se ostaci RNK. Kod malog broja Er se u citoplazmi nalazi slobodno gvozđe nevezano za hemoglobin koje se posle specijalnog bojenja vidi kao tamne granule-Ovi Er su siderociti.

Određivanje broja eritrocita u komori. Krv se razredi Hayem-ovim rastvorom u odnosu 1:200 (da bi se sprečila hemoliza). U tako dobijenoj suspenziji Er se izbroje u komori za brojanje ćelija, Neubauer ili Spenserova komora, uz korišćenje binokularnog mikroskopa.

Posle uboda, druga kap krvi se uvuče u melanžer do oznake 0,5, a zatim Hayem-ov rastvor do oznake 101, pomešati par puta sadržaj i ostaviti par minuta. Komora se prekrije pokrovnim stakлом i naneti Er dok se komora ne napuni, a zatim se pristupi brojanju. Najpre sa malim uvećanjem (200x) i spuštenim kondenzorom nađe mrežica komore, a zatim se pod srednjim uvećanjem (400x) i malo podignutim kondenzorom nađe srednji kvadrat mrežice i izbroje Er u 5 srednjih kvadrata, sleva na desno i sdesna u levo.

Broj Er

$$Er = \text{-----} \times 10 \times 200 \times 400$$

80

Određivanje broja eritrocita i eritrocitnih parametara na hematološkom brojaču- Broj Er je parametar sa malom dijagnostičkom vrednošću, jer minimalne promene u volumenu plazme menjaju njihov broj. Zato hematološki brojači direktno određuju broj Er, MCV i hemoglobin, odakle se izračunavaju eritrocitni parametri (HCT, MCH, MCHC, RDW) bez kojih se danas ne može zamisliti savremena diferencijacija eritropoetskih poremećaja. Za analizu se koristi vakutajner sa K₂EDTA. Broj Er, MCV, MCH u uzorcima EDTA krvi su stabilni najmanje 7 dana, na 4-8 °C. Materijal i opremu propisuje proizvođač, a prilikom izvođenja se strogo pridržavati uputstva proizvođača.

13. Eritrocitni indeksi (parametri)

Hematološki brojač meri broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina i srednji volumen eritrocita, a zatim izračunava sledeće parametre: HCT, MCH, MCHC, RDW. Uz osnovne hematološke parametre (broj Er i hemoglobin), eritrocitni parametri treba da posluže u lakšoj diferencijaciji anemija.

Hematokritna vrednost= MCV x broj Er

MCV- srednji volumen eritrocita

MCH- srednji sadržaj hemoglobina u Er (MCH je koncentracija hemoglobina/broj eritrocita)

MCHC- srednja koncentracija hemoglobina u Er (MCHC je koncentracija hemoglobina/hematokritna vrednost)

RDW- koeficijent varijacije distribucije volumena Er. Definiše se kao koeficijent varijacije u distribuciji volumena eritrocita. Normalne vrednosti zavise od vrste hematoloških brojača ($15,8 \pm 2,9\%$).

Klinički značaj određivanja MCV, MCHC, MCHC i RDW- ovi parametri se koriste u: klasifikaciji anemija, ranom otkrivanju sekundarnih anemija, ispitivanju etiologije anemija.

14. Metode određivanja hematokrita (HCT)

Određivanje zapremskog odnosa između krvnih ćelija i krvne plazme i važan je pokazatelj anemije. **Princip određivanja HCT mikrohematokrit metodom:** punjenjem staklene kapilare i centrifugiranjem se izdvaja sloj Er i čita se zapremina Er koja je izražena u % od zapremine ukupne krvi i označava vrednost hematokrita.

Pribor: Hematokritna centrifuga, staklene kapilare, git za zatvaranje kapilara, plamenik, čitač hematokrita, aparat za mešanje krvi. **Izvođenje:** Staklene kapilare se napune do $\frac{3}{4}$ krvlju. Kraj kapilare bez krvi se zatvori gitom ili zatali nad plamenom. Kapilare se centrifugiraju u hematokritnoj centrifugi, a zatim se hematokrit očita posebnim čitačem koji je priložen uz centrifugu. Ako nema čitača, precizno se izmeri visina stupca krvi i Er, pa se iz tih vrednosti izračunava hematokrit.

Izračunavanje:

Visina stupca Er(mm)

Hematoktit = -----

Visina stupca krvi(mm)

Referentne vrednosti: M: 0,40-0,54; Ž: 0,37-0,47; D: 0,19-0,60

Određivanje hematokrita na elektronском brojaču

Elektronski brojači krvnih ćelija automatski izračunavaju hematokrit iz eritrocita i MCV. Na ovaj način dobijena vrednost naziva se **hematokritna vrednost**. Vrednosti HCT su za oko 2% više u odnosu na hematokritnu vrednost, zato što se centrifugiranjem ne može odstraniti sva plazma između Er.

Izračunavanje:

Hematokritna vrednost= broj eritrocita($\times 10^{12}/l$) \times MCV (fL)

15. Metode određivanja hemoglobina

Hemoglobin je najvažniji sastojak Eritrocita(Er) koji se nalazi u stromi Er. Normalne vrednosti: M 140-160g/l, Ž 120-140g/l.

Metoda cijanmethemoglobin

Princip: Hemoglobin oslobođen iz Er oksiduje sa kalijum-fericijanidom, a zatim sa kalijum-cijanidom daje stabilan crveno obojen kompleks cijanmethemoglobin.

Reagensi: Drabkin-ov reagens, standardni rastvori hemoglobina- 50, 100, 150, 200 g/l.

Stabilnost uzorka: Kapilarna krv se mora odmah analizirati a uzorci EDTA krvi ostaju stabilni najmanje 7 dana na 4-8 °C.

U epruvetu se automatskom pipetom doda 5ml Drabkin-ovog reagensa, 0,02 ml krvi. Izmešati sadržaj u epruveti i posle 3-5 minuta izmeriti apsorpciju analize na 540-546nm.

Izračunavanje: Preko standarda hemoglobina (prvo se meri standard pa analiza)

Aa

Hemoglobin(g/l)----- x konc. standarda

Ast

Određivanje hemoglobina na hematološkom brojaču

Dejstvom lizirajućeg sredstva oslobađa se hemoglobin iz Er koji se određuje kao cijanmethemoglobin.

Klinički značaj: Koncentracija hemoglobina zajedno sa brojem Er i HCT predstavlja važan parametar koji se tradicionalno koristi u dijagnozi i diferencijaciji anemija, eritrocitoze i policitemije.

16. Leukociti, broj, podela, određivanje

Leukociti(Le) ili bela krvna zrnca, od $5,0-10,0 \times 10^9/l$. Podela leukocita:

1. Prema izgledu protoplazme delimo ih na granulocite (neutrofilne, bazofilne i eozinofilne) i agranulocite (monociti i limfociti).

2. Prema izgledu jedra delimo ih na segmentirane (neutrofilni, bazofilni i eozinofilni granulociti) i nesegmentirani (monociti i limfociti).

Odnos pojedinih vrsta Le kod zdravih osoba je uglavnom stalan. Taj odnos se naziva **Leukocitarna formula**.

Uloga leukocita je u odbrani organizma.

Određivanje broja Le u komori

Krv se razredi Turk-ovim rastvorom u odnosu 1:20. Er hemoliziraju, dok se jedra Le oboje ljubičasto. U tako dobijenoj suspenziji Le se izbroje u komori za brojanje ćelija.

Postupak: U melanžer za brojanje Le uvuče se krv do oznake 0,5, a zatim se krv razblaži Turk-ovim rastvorom do oznake 11, promeša lagano. Komora (Neubauer, Spencer) se napuni suspenzijom Le. Najpre se malim uveličanjem (200x) i spuštenim kondenzorom nađe mrežica komore, a zatim se izbroje Le u 4 bočna kvadrata.

Broj Le

$$Le = \text{-----} \times 10 \times 20$$

4

Referentna vrednost $4 - 10 \times 10^9/l$

Određivanje broja Le na hematoloskom brojaču

Upotreba hematoloških brojača danas daje najpreciznije rezultate za broj eritrocita i leukocita u krvi sa koeficijentom varijacije 1-3%. Hematološki brojači omogućavaju izvođenje većeg broja analiza za kraće vreme. Hematološke parametre (eritrociti, trombociti, leukociti, hemtokit, hemoglobin) brojač izdaje zajedno sa parametrima koji govore više o morfološkoj leukocita, trombocita i eritrocita (leukocitarna formula, MCV, MCH, MCHC, RDW, MPV, PDW). Hematološki brojači uglavnom koriste dva osnovna principa merenja: flow-citohemiju i analizu veličine ćelije na principu električne provodljivosti.

17. Leukocitarna formula- absolutna i relativna, normalne vrednosti, određivanje

Pored ukupnog broja Le potrebno je odrediti i međusobni odnos pojedinih vrsta leukocita (Le) i njihov relativni brojčani odnos u određenom uzorku.

Relativna leukocitarna formula-kada je pojedina vrsta Le izražena u % ukupnog broja.

Absolutna leukocitarna formula-izražavanje pojedinih vrsta u absolutnom broju.

-Neutrofilni Gr-štapirovi: 0 - 5%, 0 - $0,5 \times 10^9 /l$ (citoplazma sadrži spec.granule, jedro ima oblik štapa, nezrele forme);

-Neutrofilni segmentirani: 45 - 70%, 1,5 - 7,0 (okrugla ili ovalna ćelija, jedro sadrži 3-5 segmenta i povezano je tankim nitima, nema jedarca, ima ih oko 60% Le, sadrži niz enzima (amilaza, katalaza, nukleaza));

-Eozinofilni: 2 - 4%, 0,1 - 0,4 (okrugle ili ovalne ćelije, citoplazma obilna, crvene granule, jedro ima 2 segmenta povezana nitima, nema jedarce, sadrže histamin pa učestvuju u alergijskim reakcijama);

-Bazofilni: 0 - 1%, 0, 0 - 0,1 (okrugle ili ovalne ćelije, prečnik nešto manji od 10 mikrona, citoplazma velika i okrugla, plavo-crvene granule koje poklapaju jedro, jedro je bubrežasto sa više useka, sadrže heparin koji sprečava proces zgrušavanja krvi u krvotoku);

-Monociti: 4 - 8%, 0,2 - 0,8 (ovalnog ili okruglog oblika, sa jednim ili više produžetaka na obodu ćelije, citoplazma širokog sloja, sivo plave boje sa sitnim crvenim granulama, koje liče na prašinu: jedro veliko ovalnog oblika, potkovičasto ili bubrežasto i ima jedarnu opnu, nema jedarce, eksentrično je položeno i boji se svetlije crveno od drugih Le. Glavna funkcija im je fagocitoza);

-Limfociti: 20 - 45%, 1,0 - 4,5 (spadaju u nesegmentirane granulocitne Le. Veliki mladi Limfociti-citoplazma je bogata, nebo plave boje sa prisutnim azurofilnim granulama; jedro je okruglo, ovalno, bez jedarca. Mali stari Limfociti-citoplazma jedva vidljiva, samo na periferiji, fina plava linija se nalazi oko jedra, ne sadrži granule, izrazito je bazofilna, jedro okruglo, ekscentrično, jedarce nije vidljivo. Funkcija Limfocita je stvaranje globulina, a važna uloga im je u imunološkoj odbrani organizma jer su im antitela pretežno gama-globulini. Stvaranje i propadanje Limfocita je veoma brzo).

Krvni razmaz se pravi iz uzorka venske krvi sa antikoagulansom (EDTA) ili iz kapilarne krvi, tanak razmaz, jednim potezom. Razmaz se osuši na vazduhu. Osušeni krvni razmaz se fiksira May Grunvald 3-5 min, a zatim se rastvor ispere mlazom destilovane vode. Zatim se preparat prelije razblaženim rastvorom Giemsa i ostavi da stoji 15-30 min. Boja se ispere razblaženim puferom ili destilovanom vodom koji se ostavi na preparatu dok ne dobije crvenu boju. Preparat se ostavi da se osuši na vazduhu.

Pojedini delovi ćelija se oboje različitim bojama: DNK jedra i RNK citoplazme oboje se baznim bojama(metilensko plavo) dok se protein plazme i hemoglobin oboje kiselim bojama (eozin).

Uz upotrebu imerzionog objektiva razmaz se pregleda na tankom delu razmaza, tj. tamo gde su ćelije raspoređene jedna pored druge, po sistemu cik-cak ili dužinom krvnog razmaza, najmanje 100 (200,300,500) Le; pri tome se beleži svaka vrsta Le.

Brojanje Le dužinom krvnog ramaza se obavlja od početka do kraja razmaza u više navrata, sve dok se ne izbroji željeni broj. Potrebno je izbrojati najmanje 3 uzdužna pravca krvnog razmaza. Procentni odnos Le se zatim izračunava na osnovu izbrojanih Le.

18. Određivanje broja Trombocita

Indikacije za određivanje broja trombocita su: krvarenja nepoznate etiologije, hemoragije, suspektna stanja trošenja i razgradnje trombocita, ili povećanje broja trombocita.

Određivanje broja trombocita u komori

U melanžer za brojanje leukocita kapilarna krv se uvuče do oznake 0,5. Zatim se u isti melanžer uvuče rastvor amonijum oksalata do oznake 11,0, stavi na mešalicu i promeša najmanje 5 minuta. Neubauer-ova komora se prekrije brušenim pokrovnim stakлом, komora se napuni suspenzijom trombocita, ostavi se da stoji 30 minuta u vlažnoj komori (Petrijeva šolja sa mokrim filter-papirom na dnu). Trombociti(Tr) se broje fazno -kontrasnim mikroskopom uz pomoć srednjeg uvećanja(400x). Tr se vide kao čestice koje prelamaju svetlost. Kondenzor na mikroskopu je spušten,a dijafragma zatvorena.

Broj Tr

Izračunavanje: Broj Tr($\times 10^9/L$)= ----- x 10 x 2 0 X 400

80

Orjentacione referentne vrednosti: $140-400 \times 10^9/L$

Trombociti(Tr) su najmanje krvne ćelije, krvne pločice, i vek im je 7-10 dana. Ukoliko je broj Tr veći od $500 \times 10^9/L$ reč je o trombocitozi, a ukoliko je niži od $150 \times 10^9/L$, radi se o trombocitopeniji. Uloga Tr je zaustavljanje krvarenja putem stvaranja trombocitnog čepa i koagulacije krvi.

Određivanje broja trombocita na hematološkom brojaču

Hematološke parametre (eritrociti, trombociti, leukociti, hemtokit, hemoglobin) brojač izdaje zajedno sa parametrima koji govore više o morfologiji leukocita, trombocita i eritrocita (leukocitarna formula, MCV, MCH, MCHC, RDW, MPV, PDW).

20. Skrining test hemostaze uključuje?

Protombinsko vreme (**PT**), aktivisano parcijalno tromboplastinsko vreme (**PTT**), trombinsko vreme (**TT**) i broj trombocita.

Testovima koji spadaju u skrining hemostaze otkrivaju se svi poremećaji na nivou hemostaznog sistema. Patološki nalaz bilo kog od testova nas upućuje na to koje dodatne dijagnostičke testove treba raditi da bi se postavila dijagnoza određenog poremećaja hemostaze (krvarenje ili tromboze).

21. Prvi činilac koagulacije?

Prvi činilac koagulacije je Fibrinogen.

Fibrinogen je po strukturi protein koga sintetiše jetra. Njegova koncentracija u plazmi je 2-4 g/L. U stanjima infekcije, maligniteta, sistemskih bolesti, njegova vrednost je značajno povećana.

U trudnoći njegovo povećanje je fiziološko.

22. Periferni razmaz krvi

U perifernoj krvi zdravih osoba nalaze se samo zrele ćelije pojedinih krvnih loza: eritrociti, granulociti (segmentirani, nesegmentirani neutrofilni, bazofilni i eozinofilni granulociti), limfociti i monociti, trombociti. Analizom razmaza periferne krvi iz prsta dobijaju se podaci o izgledu, veličini i broju krvnih ćelija.

Kad je nalaz KKS abnormalan treba pregledati razmaz periferne krvi. U tim će se slučajevima u razmazu često naći morfološke abnormalnosti koje ne mogu otkriti automatski brojači ćelija. Ovaj je podatak često ključan za razrešenje etiologije abnormalnog nalaza u KKS-u.

Ni jedna dijagnoza anemije nije potpuna bez pregleda razmaza periferne krvi, jer taj nalaz može otkriti uzrok anemije. Kvalitet podataka dobijenih iz razmaza periferne krvi zavisi od toga kako je taj razmaz pripremljen.

Periferni razmaz krvi daje informaciju važnu za : **anemije, leukoze i trombocitoze**.

Najvažniji podatak koji možemo dobiti pregledom razmaza je oblik eritrocita koji može ukazati na tip anemije. Izmenjen oblik i pojava eritrocita u obliku suze, target ćelije, fragmentisanih, sitnih ili velikih eritrocita je veoma važna. Takođe i promenjen oblik polimorfonukleara (hipersegmentiranost) može biti važan znak koji ukazuje na određenu vrstu anemije (primer megaloblastna anemija).

23. Da li se Coombs-ov test koristi u dijagnostici autoimunih hemoliznih anemija?

Coombs-ov test direktni i indirektni se koriste za dijagnostiku antitela koja mogu biti vezana za eritrocite ili biti prisutna u serumu bolesnika. Ovaj test je važan za postavljanje dijagnoze autoimune hemolitičke anemije.

24. Šta su trombofilije?

Trombofilija predstavlja sve urođene i stečene poremećaje hemostaze koji doprinose nastanku tromboza i komplikacijama u trudnoći.

25. INR ili trombotest

INR predstavlja Internacionalni normalizovani ratio. Dobija se kao količnik PT pacijenta i normalne plazme stepenovan sa osetljivošću (ISI) tromboplastina koji se koristi za izvođenje PT testa. Koristi se za kontrolu antikoagulantne terapije.

26. Kada nastaje povećan broj trombocita?

Povećan broj trombocita nastaje u sklopu maligniteta, u sklopu određenih bolesti i u sklopu anemije.

Povećanje broja trombocita u navedenim stanjima je **sekundarno** i obično nije veće od $700 \times 10^9/L$. Ne zahteva posebnu terapiju. Terapija se sprovodi tako da se leči poremećaj u sklopu kog se javlja trombocitoza.

27. Trombocitopenija

Trombocitopenija je smanjen broj trombocita i može biti:

- Umerena trombocitopenija, $100-150 \times 10^9/L$
- Srednje teška trombocitopenija, $50-100 \times 10^9/L$
- Izražena ili teška trombocitopenija, ispod $50 \times 10^9/L$

Srednje teška trombocitopenija i izražena ili teška trombocitopenija su praćene krvarenjem i leče se primenom koncentrata trombocita.

28. Šta je D-dimer?

D-dimer je nećešće primenjivan test hemostaze u urgentnim stanjima. Vrednosti D-dimera su povećane kod pacijenata sa akutnim venskim trombozama/plućnim embolijama, upalnim procesima, malignim bolestima, sistemskim bolestima a u trudnoći je fiziološki povećan D-dimer.

Referentne vrednosti zavise od vrste reagenasa: 0,5 ng/L (aparat Siemens), tj. 250 mg/L (aparat IL).

29. Šta sadrži propratni (sprovodni) list koji se dostavlja uz svaki uzorak koji se šalje na bakteriološki pregled?

Pored osnovnih podataka o bolesniku, sadrži i precizne podatke o poreklu i prirodi materijala, o datumu i trenutku njegovog uzimanja, kakav se pregled traži, uputna dijagnoza, vreme početka bolesti, i druge pojedinosti neophodne za pravilnu obradu materijala.

30. Posle završenog analiziranja, izdavanja rezultata, gde, kako i koliko se dugo čuvaju uzorci?

Uzorke treba čuvati 24 casa na +4°C posle izdavanja rezultata; moraju biti zatvoreni, obeleženi. Na ovaj način je moguće proveriti rezultat i potvrditi nalaz ili ustanoviti da je rezultat netačan, kako bi se ponovnim analiziranjem dobio valjan rezultat. Ova mera predostrožnosti prvenstveno ima namenu da zaštiti pacijenta ali i laboratoriju.

31. Kada treba skinuti povesku za vađenje krvi?

Povesku treba držati najduže do 60 sekundi od momenta stavljanja iste. Hemokoncentracija uzorka nastaje usled dužeg držanja poveske, što se direktno odražava na kvalitet analiza.

32. Sta je hemostaza i koliko nivoa u hemostaznom sistemu postoji?

Hemostaza predstavlja prirodni proces zaustavljanja krvarenja iz povređenog krvnog suda. Isto tako, hemostaza je fiziološki proces stalnog održavanja ravnoteže između mehanizama koji dovode do zgrušavanja krvi i mehanizama koji zgrušavanje sprečavaju. Kao rezultat ove ravnoteže održava se nesmetano cirkulisanje krvi. **Postoje tri nivoa u hemostaznom sistemu.** U hemostazi učestvuju vaskularni, trombocitni činioci i koagulacija.

U vaskularnoj fazi dolazi do smanjenja protoka krvi na mestu povrede vazokonstrikcijom, uzrokovanim refleksnim putem, i traje kraće od 1 minute i kompresije zida krvnog suda izlivenom krvi u okolno tkivo.

Trombocitna faza predstavlja nastavak vaskularne faze i započinje u prvim sekundama posle povrede. Trombociti se adherišu na ogoljen kolagen, najverovatnije preko von Willebrandovog faktora.

Na adherisane Tr, koji u početku čine jedan sloj na površini oštećenog endotela, u daljem procesu priljubljuju se Tr iz cirkulacije, stvarajući aggregate Tr. Tr se zatim aktiviraju, menjaju oblik, dolazi do kontrakcije mikrotubula u Tr i izbacuje se sadržaj granula(fenomen oslobađanja). Oslobađa se tromboksan, serotonin.

Stvara se trombocitni beli tromb koji može da zaustavi krvarenje iz malih krvnih sudova.

Koagulacijska faza predstavlja proces stvaranja fibrinskog ugruška (koagulum), kojim se jedino može zaustaviti krvarenje iz većih krvnih sudova. Proces koagulacije se može podeliti u 3 faze. U prvoj fazi se stvara aktivni tromboplastin. U drugoj, pod dejstvom aktivnog tromboplastina dolazi do pretvaranja protrombina u trombin. U trećoj fazi, pod dejstvom trombina, rastvorljivi fibrinogen pretvara se u nerastvorljivi fibrin.

33. Sideropenijska anemija: znaci, uzroci, simptomi i laboratorijski nalaz

Tri osnovna znaka ove anemije su hipohromija (eritrociti su slabije obojeni, sa proširenom bledom zonom u sredini), mikrocitoza (eritrociti su manji nego normalno) i hiposideremija. **Količina gvožđa** (Fe) u krvnom serumu, tkivnim depoima i koštanoj srži je **smanjena**.

Najčešći uzrok je stalno gubljenje Fe iz organizma malim, čestim i neprimetnim krvarenjima. Uzrok deficit mogu biti i stanja koja zahtevaju povećane potrebe gvožđa (rastenje, trudnoća, laktacija), zatim smanjena apsorpcija Fe u organima za varenje zbog njihovog oboljenja.

Hronična krvarenja su najčešći uzrok sideropenijskih anemija. Krvarenja iz polnih organa žene (miom uterusa, hormonalni poremećaji), krvarenja iz želudačno-crevnog trakta (ulkusna bolest, hijatus hernija, karcinom želuca i creva, hemoroidi...) izazivaju deficit Fe u organizmu i pojavu anemije.

Simptomi: malaksalost, zamaranje, nesvestice, vrtoglavice, glavobolja, lupanje srca.

Laboratorijski nalaz: Smanjena koncentracija hemoglobina u krvi, indeksa bojenja, MCH (srednja vrednost količine hemoglobina u jednom eritrocitu) i MCHC (srednja vrednost koncentracije hemoglobina). Broj Er je smanjen. Vrednost hematokrita je ispod normale, što pokazuje da je ukupna zapremina Er smanjena. U serumu su smanjene količine Fe, a kapacitet transferina za vezivanje gvožđa je povećan.

Lečenje: Ukloniti uzroke anemije. Davanje gvožđa oralnim putem, paranteralna primena i intravenska.

34. Fizička svojstva eritrocita(Er)

- **Sedimentacija** Er- taloženje Er na dno suda u kome je izvađena krv kojoj je dodato neko antikoagulantno sredstvo;
- **Aglutinacija** Er- trajno slepljivanje Er u manje ili veće grupe;
- **Hemoliza**- izlazak hemoglobina iz Er zbog oštećenja Er;
- **Propustljivost** opne Er je nejednaka za supstance krvne plazme;
- **Osmotska rezistencija**- otpornost Er prema hipotoničnim rastvorima.

35. Sedimentacija eritrocita (SE)

Podrazumeva brzinu taloženja eritrocita (Er) na dno staklenog suda, izazvanu silom zemljine teže iz uzorka krvi sa antikoagulansom (u gornjem delu se izdvaja plazma). Er se talože jer su relativno teži od leukocita i plazme.

Određivanje sedimentacije po Westergreen metodi

Iz epruvete sa citratnom krvi (odnos citrata i krvi 1:4) (pipeta graduisana do 200 mm). Krv se uvuče u Westergreen pipetu do oznake 0. Pipeta se postavi na odgovarajuće mesto na stalku za pipete. Posle prvog i drugog sata određuje se visina plazme iznad nivoa istaloženih Er u mm, što predstavlja brzinu sedimentacije. Zabeležiti vreme i vrednosti čitati posle prvog i drugog sata.

Referentne vrednosti: Ž: prvi sat 2-8(10). M; prvi sat 2-6(10).

SE je nespecifična. Nema dijagnostički značaj, ali ima prognostički.

Sedimentacija se danas određuje u vakutajner epruvetama sa antikoagulansom natrijum citratom, modifikovana Westergreen metoda i određuje se samo prvi sat.

36. Određivanje vremena krvarenja

Ovaj test predstavlja vreme koje protekne od momenta povrede sitnih krvnih sudova (kapilara) do prestanka isticanja krvi. Vreme krvarenja zavisi od broja i funkcije trombocita, kao i stanja zidova krvnih sudova. Produceno vreme krvarenja se javlja kod oštećenja krvnih sudova, smanjenja broja trombocita i poremećaja funkcije trombocita (adhezija, agregacija).

Metoda po Djuku

Ovom metodom određuje se primarno vreme krvarenja koje protekne od uboda vrha prsta ili ušne školjke do momenta prestanka isticanja krvi. Vrh usne školjke ili vrh prsta se dezinfikuje i osuši. Lancetom se napravi ubod dubine do 3 mm. Zabeleži se vreme kada prva kap krvi krene, svakih 30 sec. krv se upija ivicom filter papira ne dodirujući ubodnu ranu. Hronometar se zaustavlja kada krv prestane da ostavlja trag na filter papiru. Očitano vreme na hronometru predstavlja vreme krvarenja. Normalna vrednost vremena krvarenja je od 1 do 3 minuta.

Metoda po Ajviju

Koža podlaktice se dezinfikuje alkoholom, osuši. Na nadlaktici iste ruke se stavi manžetna manometra i napumpa do 40 mm Hg. Lancetom napraviti zarez u koži podlaktice, dužine 10 i dubine 2 mm. Hronometar se pušta u rad čim se načini zarez. Ivicom filter papira upija se krv koja ističe iz zareza. Krv se upija svakih 30 sec dok krvarenje ne prestane. Tada se zaustavi hronometar. Normalna vrednost je u intervalu od 1 do 7 min.

37. Sterilizacija, pojam i podela

Sterilizacija je proces uništavanja svih mikroorganizama, kako patogenih, tako i saprofita, bilo u vegetativnom ili sporogenom obliku.

- Sterilizacija toplotom, suva i vlažna toplota
- Zračenje, ultravioletno, jonizujuće
- Filtracija

38. Sterilizacija suvom topotom

Suva topota uništava mikroorganizme potpomaganjem destruktivne oksidacije esencijalnih čelijskih sastojaka. Ubijanje najrezistentnijih spora suvom topotom zahteva temperature od **oko 180 °C u toku 60 min**. Suva topota se upotrebljava za sterilizaciju staklarije, špriceva, metalnih instrumenata, koji treba da su suvi i uvijeni u hartiju.

Sterilizacija plamenom (uvođenje eze u plamen do usijanja). **Opaljivanje** nad plamenom ruba epruvete, pipete, i drugi stakleni predmeti čime se unište vegetativni oblici mikroorganizama. **Spaljivanje** (uništavanje inficiranih materijala).

Sterilizacija vrelim vazduhom se sprovodi u **suvim sterilizatorima**, zagrevanjem električnom strujom u toku **dvočasovnog izlaganja temperature od 160° C ili jedan čas na 180° C**. Sudovi se stavljuju u hladan aparat. Kad se postigne željena temperatura meri se vreme sterilizacije.

39. Sterilizacija vlažnom topotom

Pasterizacija (pasterizacija mleka, 30 min na 62 °C ili 20 sec na 71°C. Ne uništava spore).

Tindalizacija ili frakciona sterilizacija (tri uzastopna dana se materijal podvrgava zagrevanju na 62°C u vodenom kupatilu u toku 30 min. U međuvremenu se stavlja u termostat preko noći na 37°C. Ako je u materijalu bilo spora, one u povoljnoj sredini prelaze u vegetativni oblik koji bivaju ubijeni pri sledećem zagrevanju).

Kuvanje (na 100 °C u toku 10-15 min je dovoljno da ubije nesporogene i mnoge, ali ne sve sporogene organizme (Cl. Tetani preživi 2-3 časa kuvanje)).

Koch-ov lonac ili sterilizacija pomoću strujeće vodene pare na 100 °C, vrši se u toku **60-90 min**. Aparat je cilindričnog oblika sa dvostrukim dnom od kojih je gornje rešetkasto, na koje se stavlja material za sterilizaciju. Ispod njega se nalazi voda koja se zagreva do ključanja, pri čemu para prolazi kroz materijal i izlazi pokraj ivica poklopca, pošto nije hermetički zatvoren. Ova temperatura ne ubija spore, ali ubija sve vegetativne bakterijske oblike (podloge ne gube vodu, rukovanje jednostavno).

Sterilizacija zasićenom vodenom parom pod pritiskom je najpouzdaniji način sterilizacije. Aparat je **autoklav**, on se hermetički zatvara, opremljen je manometrom i termometrom, ispusnim i sigurnosnim ventilom. Osnovno je da se kroz ispusni ventil istisne sav vazduh dok ne pode gust mlaz zasićene vodene pare-kada se ispusni ventil zatvara. Tada počinje da se penje pritisak koji se čita na manometru i odgovara određenoj temperaturi. Kada se postigne željeni pritisak počinje da se meri vreme sterilizacije. Sigurnosni ventil se sam otvara u slučaju da se pritisak u aparatu podigne preko dozvoljenog. Po završenoj sterilizaciji, autoklav se ne otvara odmah, jer usled nagle promene pritiska može doći do ključanja tečnosti, prskanja boca i povreda. Najpre se otvoriti ispusni ventil, izjednače se spoljni i unutrašnji pritisak i temperature, a zatim se otvara autoklav. Sterilizacija se sprovodi pod pritiskom od **1 atmosfera (121° C) u toku 30 min**.

40. Zračenje kao vid sterilizacije

Ultravioletno zračenje- Germicidne lampe koje emituju ultravioletna zračenja široko se upotrebljavaju za redukovanje mikrobijske populacije, napr. u bolničkim operacionim salama, u farmaceutskoj industriji, prehrabenoj,...UV zraci imaju malu sposobnost da prodiru u materiju.

Njihovo dejstvo je pretežno površinsko. Zračna energija sunčeve svetlosti je sastavljena delom od UV zračenja koji imaju izraženi letalni efekat na mikroorganizme, te možemo reći da sunčeva svetlost ima mikrobicidnu sposobnost u ograničenom stepenu.

Jonizujuće zračenje X zraci (Roentgen zraci) imaju letalno dejstvo na mikroorganizme i veoma su prodorni, ali nisu praktični za kontrolisanje mikrobijske populacije jer su veoma skupi i teško mogu efikasno da se koriste jer se radijacije rasprostiru u svim pravcima od njihove tačke nastajanja.

Gama zraci- Gama zrake emituju izvesni radioaktivni izotopi kao pr. kobalt. Veliko prodiranje u materiju, letalni za mikroorganizme. Problem: konstrukcija opreme za bezopasno dejstvo.

Zračenje elektronskim zracima ili Katodni zraci- Radijacija elektronskim zracima se sastoji od izlaganja jednoj struji elektrona koja ako je dovoljno visokog intenziteta deluje mikrobicidno.

41. Dezinfekcija

Uništavanje vegetativnih oblika patogenih bakterija u spoljnoj sredini, čime se sprečava širenje infekcije. Vrši se raznim sredstvima a posebno mesto pripada hemijskim dezifijensima. Ako sprečavaju raznožavanje bakterija deluju bakteriostatički a ako dovode do destrukcije ćelije i smrti bakterija, baktericidno. Mehanizam delovanja zavisi od hemijske prirode dezifijensa koji pri dodiru sa bakterijskom ćelijom izaziva fizičko-hemijske promene. Dezinfekciona sredstva se prema mehanizmu delovanja klasifikuju na:

Sredstva koja denaturišu proteine- baze, 5% rastvor alkalnih hidroksida i kalcijum hidroksid. Deluju na Mycobacterium tuberculosis;
-kiseline 3% rastvor borne kiseline. Hlorovodonična, sumporna, azotna razaraju predmete;
-alkoholi su slabo dezinfekciono sredstvo, baktericidno dejstvo, deluju na vegetativne oblike. Najčešće se upotrebljava 70% etanol.

Sredstva koja menjaju funkciju ćelijske ovojnica ili je razgrađuju-deluju na lipide i proteine koji ulaze u sastav ćelijske ovojnica, što dovodi do razgrađivanja ćelijskog zida ili citoplazmatske membrane.

-deterđenti. Po svojim hemijskim osobinama se dele na katjonske(asepsol), anjonske(su sapuni, najčešće se koristi natrijumsterat) i nejonske(ne pokazuju antibakterijsku aktivnost).

-fenol- deluju baktericidno i bakteriostatički. Najčešće se upotrebljava fenol (karbolna kiselina) koji u malim koncentracijama deluje bakteriostatički a u većim baktericidno. Zatim krezol, lizol. Fenoli se koriste za dezinfekciju ekskreta, rublja, nameštaja.

Dezinfekciona sredstva koja reaguju sa funkcionalnim grupama proteina, oksidišu i blokiraju reaktivne grupe proteina u enzimima bakterijske ćelije što dovodi do smanjene aktivnosti ili do inaktivisanja bakterijskih enzima.

-oksidaciona sredstva- vodonik peroksid, hlor (baktericidna aktivnost. Njegova dezinfekciona aktivnost rezultat je direktnog dejstva hlora na vitalne sastojke ćelije-protoplazma, enzimi. Hlor i njegova jedinjenja se najčešće koriste za dezinfekciju vode za piće, plivačkih bazena), jod.

-teški metali- slabo baktericidno dejstvo. Praktičnu primenu nalaze samo soli i organski kompleksi žive, srebra i donekle bakra.

-formaldehid je vrlo efikasno dezinfekciono sredstvo u gasovitom stanju i rastvoru kao formalin. Ubija sve vrste bakterija i spore. Formalin se koristi kao 3-5% rastvor i služi za dezinfekciju čvrstih predmeta.

-antiseptične boje-trifenilmetanske boje, akridinske boje.

42. Kontrola sterilizacije

Kontrola sterilizacije se vrši radi utvrđivanja da li je u nekom aparatu za sterilizaciju svuda postignuta potrebna temperatura.

Kontrola rada suvih sterilizatora i autoklava po zakonskoj osnovi se vrši jednom u 6 meseci (uvek raditi posle popravke aparata, nabavke novog aparata, nakon uočenih propusta u procesu sterilizacije).

Fizička kontrola- kontrola temperature, pritiska, zasićenosti vodenom parom;

Hemijska kontrola- Hemikalije koje na određenoj temperaturi i/ili pritisku tokom određenog vremena menjaju boju.

Pokazuju da su predmeti prošli ciklus sterilizacije i da su parametri zadovoljeni tokom procesa. Ne dokazuju da su mikroorganizmi i spore uništeni.

Kontrola procesa:

- Razlikuje sterilisan od nesterilisanog materijala
- Test-trake (samolepljive) sa hemijskim indikatorom
- Lepe se na spoljašnju stranu materijala koji se steriliše
- Za autoklav: menjaju boje posle 10 minuta na 121°C
- Za suvi sterilizator: menjaju boju posle 10 minuta na 160°C

Kontrola rada:

- Bowie-Dick test
- Stavlja se u prazan autoklav ispred vrata ili napunjen između pakovanja
- Sterilizacija se sprovede uobičajenim postupkom
- Nakon vađenja, otpakuje se i ispita indikatorski list
- Uniformno crn, ako je postignuta adekvatna evakuacija vazduha
- Na poledini – napisati datum i vreme kontrole, ime osobe koja je radila testiranje i list odložiti u registar kontrole autoklava

Biološka kontrola

Biološki indikatori dokazuju da su vegetativni oblici i spore uništeni u procesu sterilizacije

Biološka kontrola se vrši pomoću bakterijskih spora, poznate rezistencije prema povišenoj temperaturi. Korišćen je *Bacillus subtilis* čije su se spore stavljaće u paketiće od hartije, a zatim se u delove materijala koji se sterilišu. Po završenoj sterilizaciji, sadržaj iz paketića se zasejavao na adekvatnu podlogu i inkubirao potrebljno vreme na 37°C. Ako u podlozi iz spora ne proklijaju vegetativni oblici, to znači da je sterilizacija uspešna.

Za suvu sterilizaciju – papirići (stripovi) sa inokulisanim sporama 2 vrste bakterija: *Geobacillus stearothermophilus*(ATCC 7953) i *Bacillus atropheus*(ATCC 9372)

Za autoklave – sistemi (epruveta sa hranljivim medijumom + papirni disk impregniran sporama) sa *G.stearothermophilus*-om.

Biološka kontrola rada autoklava i suvog sterilizatora

- Jednu ili više epruveta staviti na najnepristupačnija mesta u autoklavu i suvom sterilizatoru (»hladni džepovi»).
- Obaviti sterilizaciju uobičajenim postupkom
- Nepromenjena boja DOKAZUJE da je postupak sterilizacije na 121°C u autoklavu i 60 minuta na 180°C u suvom sterilizatoru) USPEŠAN.

43. Kvalitativna analiza urina

Izgled urina (bistar, svetlo do tamnožute boje)

Boja urina, Miris urina (aromatičan miris nedefinisanog porekla), Zapremina urina (prosečna zapremina urina koju tokom dana izluči zdrava osoba iznosi 1200-1500 ml. Izlučivanje manje od 500ml urina dnevno je **oligurija**, a potpuni prestanak izlučivanja je **anurija**, a izlučivanje u zapreminama većim od 2000ml je **poliurija**), Merenje pH urina (prosečan pH je 6,0. Obično je dovoljno da se pH uradi pomoću indikator papira, ili pomoću pH- metra), Merenje relativne gustine (1,016-1,022 u toku 24 časa. Relativna gustina se meri **urinometrom**), Merenje osmolalnosti (zdrave osobe izlučuju urin čija je osmolalnost 500-800mOsm/kg vode), Dokazivanje proteina u urinu, Dokazivanje šećera u urinu (Glukoze normalno nema u urinu. Dokazuje se redukcijom bakar sulfata u alkalnoj sredini uz zagrevanje), Ketonska tela u urinu (u normalnom urinu ih ima sam u tragovima. Povećane vrednosti kod šećerne bolesti, gladovanja), Urobilinogen u urinu (Dokazivanje Erlihovom metodom. U epruvetu sipati 3 ml urina i dodati istu zapreminu Erlihovog rgs. Odmah dodati 6 ml zasićenog rastvora Na acetata i izmešati. Reakcija je pozitivna ako se dobije svetloružičasta do tamnocrvena boja, koja potiče od aldehida. Dokazivanje urobilinogena u urinu ima značaja za diferencijalnu dijagnozu žutica), Bilirubin u urinu, Krv u urinu (kod zdravih osoba nema krvi u urinu), Nitriri u urinu (U svežem urinu ih normalno nema, znak su infekcije urogenitalnog trakta).

44. Kvantitativna analiza urina i konzervansi

Za kvantitativnu analizu urina je potrebno znati zapreminu u određenom vremenskom periodu, pa se za te svrhe najčešće koristi **24-časovni urin**.

Ovaj urin se sakuplja tako što pacijent urinira ujutru u 08h(pre doručka), taj uzorak urina se odbaci, a zatim sakuplja sve sledeće uzorke u toku dana i noći, zaključno sa onim u 08h sledećeg dana. Izmeri se ukupna zapremina urina za 24 sata, urin se promeša i analizira.

U toku sakupljanja urin se obavezno čuva na hladnom ili mu se dodaju različiti konzervansi, zavisno od sastojaka koji se određuje. Kao konzervansi se najčešće koriste formaldehid, toluol, timol, hloroform i borna kiselina. Toluol i borna kiselina se koriste za opšte potrebe jer ne utiču na metode za određivanje glukoze, proteina i ketonskih tela. Formaldehid je pogodan kao konzervans kada treba sačuvati ćelijske elemente i cilindre, a da bi se sačuvala glukoza dodaje se natrijum-fluorid.

45. Analiza sedimenta urina

Sediment urina sadrži sve nerastvorljive materijale (uobičene elemente) koji se sakupljaju u urinu u procesu glomerularne filtracije, i tokom prolaska tečnosti kroz tubule i urinarne puteve. Ćelije koje se nalaze u urinu potiču od epitelnih ćelija gornjih i donjih delova urinarnog trakta i ćelija iz cirkulacije (Er i Le).

Druga vrsta uobličenih elemenata koji se nalaze u urinu su **cilindri**, koji nastaju u bubrežnim tubulima i sabirnim cevčicama. Organizmi (bakterije, gljivice, paraziti) i neoplastične ćelije su strani elementi za urinarni sistem pa njihova identifikacija može biti važna za dijagnozu nekih bolesti urinarnog sistema.

Za analizu sedimenta urina se koristi prvi jutarnji ili neki drugi uzorak urina. Urin se analizira svež, pošto stajanjem dolazi do lize prisutnih ćelija (ili se čuva u frizeru).

Izvođenje

U epruvetu za centrifugiranje odmeriti 10 ml dobro izmešanog urina i centrifugirati (2000 obr./min.). Supernatant se odlije dekantovanjem, a sediment se resuspenduje u 1 ml urina.

Na predmetno staklo se stavi kap resuspendovanog urina i pokrije pokrovnom ljuspicom, tako da se ne stvore mehurići.

Preparat se pregleda malim uvećanjem (x100) i smanjenim svetlom. Sistematski se pregledaju sve 4 strane pokrovne ljuspice, jer se cilindri često nalaze uz samu ivicu. Preparat može biti obojen ili neobojen, zavisno od vrste uzorka i iskustva laboranta. Na kraju se elementi identifikuju pod velikim uvećanjem (x400).

Eritrociti i leukociti (mogu se naći kod zdravih osoba, Er 0-2, Le 0-5); Epitelne ćelije (u normalnom urinu se mogu naći mali broj tubularnih ćelija, usled starenja ćelija); Kristali (u sedimentu normalnog urina se mogu naći kristali fosfata, urata i oksalata); cilindri (u normalnom urinu se može naći vrlo mali broj hijalinih cilindara. Broj cilindara može biti veliki posle teškog fizičkog napaora); Bakterije, gljivice i paraziti se normalno ne nalaze u urinu.

46. Dokazivanje proteina u urinu

Ukoliko su na test traci proteini u urinu pozitivni, dobijeni rezultat možemo proveriti sa:

Sulfosalicilnom kiselinom, koja taloži proteine bez zagrevanja, a metoda može da se koristi kao semikvantitativna. Princip reakcije se sastoji u tome da sulfosalicilna kiselina cepa veze između proteina i vode, a zatim se sama vezuje za proteine. Tako nastali aglomerati vezuju se međusobno u još veće aglomerate, koji nisu rastvorljivi u vodi.

Izvođenje: U 2 epruvete se ulije po 3 ml centrifugiranog urina, a zatim se u jednu dodaje 2-3 kapi reagensa i pomešaju. Epruveta sa čistim urinom služi kao kontrolni uzorak, s kojim se upoređuje sadržaj druge epruvete. Stepen zamućenja ili precipitacija se tumači na sledeći način:

Negativni- bez zamućenja, u tragu- jedva primetno zamućenje (0,05 g/l), 1+ zamućenje bez granulacije (0,5), 2+ zamućenje sa granulacijom (2), 3+ zamućenje sa granulacijom i fokulacijom (5) i 4+ masa precipitiranih proteina ili čvrst precipitat (10 g/l ili više).

Pojava proteina u urinu se naziva **proteinurija**.

47. Dokazivanje bilirubina u urinu

Bilirubin se izlučuje urinom samo u patološkim stanjima, i to kao glukuronid. To se dešava kod opstrukcije žučnih puteva ili kod hemolitčne žutice. Pojava bilirubina u urinu je **bilirubinurija**.

Dokazivanje bilirubina se izvodi pomoću reagens traka ili metodom **po Rosinu**.

Bilirubin se oksiduje pomocu **joda** do biliverdina, koji je zelene boje.

U epruvetu sipati oko 5ml urina i zatim niz zid pažljivo dodati 1 ml reagensa. Ako u urinu ima bilirubina, na dodirnoj površini će se pojaviti prsten zelene boje koji potiče od biliverdina.

48. U početnom oštećenju funkcije jetre dolazi do porasta biohemijskih parametara. Kojih?

Kod različitih oboljenja jetre menja se nivo serumskih enzima. Stepen povišenja aktivnosti enzima zavisi od tipa oboljenja, a najčešće se mere aktivnosti ALT, AST i GGT.

49. Holesterol i frakcije holesterola

Koncentracija i međusobni odnos lipidnih komponenata u organizmu daju lipidni status pacijenta i mogu predvideti rizik od ateroskleroze.

Lipidi (holesterol, trigliceridi, fosfolipidi) su energetske i gradivne materije. Holesterol je prekusor molekula steroidnih hormona. Sintetiše se najviše u jetri i tankom crevu i u cirkulaciji se nalazi esterifikovan.

Lipidi su u cirkulaciji vezani za belančevine-lipoproteini.

Frakcije lipoproteina se međusobno razlikuju po svojoj gustini i razdvajaju se elektroforezom na **HDL, LDL, VLDL**.

50. Unutrašnja kontrola u biohemijskoj laboratoriji?

Unutrašnja kontrola se sastoji u praćenju različitih aspekata, procedura koje se izvode u laboratoriji. To obuhvata testiranje preciznosti rada, statističu analizu, kontrolu iz dana u dan. Unutrašnja kontrola treba da obezbedi kontinuiranu evaluaciju pouzdanosti rada u laboratoriji.

Unutrašnja kontrola se mora sprovoditi redovno i svakodnevno. Koriste se kontrolni serumi za bar dva nivoa odlučivanja (normalni i patološki). Kvalitet i redovna unutrašnja kontrola je osnov tačnosti u laboratoriji.

51. Spoljašnja kontrola u biohemijskoj laboratoriji?

Spoljašnja kontrola rada u svim laboratorijama je zakonska obaveza i preduslov za svaki vid akreditacije(ATS-akreditaciono telo Srbije ili u okviru Akreditacije zdravstvenih ustanova).

Spoljašnja kontrola sprovodi se kontrolnim materijalom koji laboratorija dobija od institucije koja se bavi spoljašnjom kontrolom, organizovana kao nacionalna, regionalna ili međunarodna.

52. Šta su hranjive podloge, sastavni delovi?

Hranjive podloge predstavljaju kompleks u kome su veštacki sjedinjeni neophodno potrebni elementi za održavanje života bakterija, njihovih bioloških i biohemijskih osobina i njihove reprodukcije.

Najvažniji sastavni delovi podloga su: voda (destilovana ili dejonizovana), mesni ekstrakti (mesni bujon i mesna voda), peptoni, ugljeni hidrati (izvor energije), mineralne materije, radi održavanja izojonije i izotonije skoro svim hranjivim podlogama se dodaje kuhinjska so, telesne tečnosti životinja ili ljudi (krv, serum, žuč) se koriste kao podesni sastojci hranjivih podloga. Agar agar je sasušena alga koja rastvorena u vodi nabubri, u vreloj vodi prelazi u koloidno stanje da bi kada se ohladi na 45°C prešla u gel koji hranjivoj podlozi daje čvrstinu i providnost. Čist agar nije hranjiv. Za ispitivanje pokretljivosti se koriste male koncentracije (0.3%-0.5), a za druge svrhe 3%. Indikatori se dodaju da bi se uočile fermetativne osobine pojedinih mikroorganizama. Boje služe da bi se zaustavio rast pojedinih mikroorganizama, a omogući rast jednoj bakterijskoj vrsti. Faktori rasta (vitamini b kompleksa).

53. Podela hranjivih podloga

Prema poreklu hranjive podloge se dele na *prirodne* (krv, serum, jaja, mleko) i *veštačke* koje se spravljaju od raznih sintetskih materija uz dodatak prirodnih produkata.

Prema koezistenciji se dele na *čvrste* (kojima je dodat agar ili su čvrstinu doobile koagulacijom belančevina (Loffler-ov koagulisan serum), *tečne*, one kojima za osnov služi bujon ili mesna voda i *polučvrste*, koje se koriste za ispitivanje pokretljivosti pojedinih bakterijskih vrsta.

Prema nameni se dele na one koje služe za *kultivisanje aerobnih* i one koje se koriste za *kultivisanje anaerobnih bakterija*.

Prema sastavu se dele na jednostavne (služe da se na njima razmnožavaju bakterije ili kao osnova za složene hranjive podloge, pa se nazivaju i osnovne-bujon, peptonska voda, mesna voda) i složene koje sadrže više hranjivih supstanci.

Zavisno od toga čemu hranjive podloge služe one se dele na:

-diferencione, su ona složena čvrsta hranilišta na kojima se kolonije jedne bakterijske vrste razlikuju po obojenosti od kolonija druge bakterijske vrste (Endo agar),

-selekcione, su složena hranilišta koja stimulišu rast jedne bakterijske vrste, a zaustavljaju rast ostalih mikroorganizama (SS agar, salmonele i shigele rastu na njoj),

-elekcione, dopuštaju ubrzani rast jednoj bakterijskoj vrsti, dok ostali mikroorganizmi rastu, ali njihov rast započinje kasnije (Loffler-ov koagulisani serum),

-specijalne su one na kojima se razmnožava bakterijska vrsta (Lowenstein-ova podloga),

-podloge za obogaćivanje rasta, su one u kojima se zaustavlja rast onih mikroorganizama koji sprečavaju razmnožavanje bakterija koje želimo da dobijemo u većoj količini (Selenit F bujon),

-biohemiske hranjive podloge- su one kojima se ispituju biohemiske osobine pojedinih mikroorganizama (pr. Šareni niz šecera).

Složene hranjive podloge- Krvni agar (služi za ispitivanje sposobnosti pojedinih bakterijskih vrsta da hemoliziraju eritrocite), Endo agar (diferencijalna podloga koja služi za razlikovanje lakoza pozitivnih od lakoza negativnih enterobakterija. Mikroorganizmi koji razlažu lakozu kolonije boje ljubičasto a lakoza negativne su neobojene), SS agar (selektivna hranjiva podloga za izolovanje šigela i salmonela. Lakoza pozitivne bakterije se oboje roze), Lowenstein-ova podloga (je specijalna podloga za bacile tuberkuloze), Loffler-ova hranjiva podloga (je elektivna i služi za kultivisanje bacila difterije).

54. Bakteriolski pregled-uzimanje i slanje materijala

Bakteriološka dijagnostika obuhvata pravilno odabiranje i uzimanje uzorka, odgovarajuće pakovanje i adekvatan transport materijala do laboratorije, obradu i zasejavanje materijala na odgovarajuće hranjive podloge, izolovanje i identifikaciju uzročnika, ispitivanje njegove ostljivosti na veći broj savremenih hemioterapeutika, blagovremeno izdavanje rezultata i njihovo pravilno tumačenje. Prva i možda presudna karika je pravilno odabiranje i uzimanje uzorka.

Pre svega treba uzeti pravi materijal u pravo vreme, tj onaj materijal u kome se kod date bolesti nalaze uzročnici i u onom stadijumu oboljenja kada su oni prisutni u materijalu. Materijal mora da potiče sa mesta infekcije bilo da se uzima vestačkim postupkom (brisom, punkcijom) bilo da je dobiten prirodnim putem (mokrenje, iskašljavanje). Uzimanje materijala se vrši aseptično, sterilnim priborom a uzeti materijal treba staviti u sterilne odgovarajuće posude. Kada uslovi

dozvoljavaju, bolesnički materijal treba odmah zasejati u odgovarajuće hranjive podloge. Ako materijal nije odnahnut zasejan, treba ga staviti u laboratorijske posude, koje se dobro zatvore, zaštite od loma i svetlosti i što je moguće pre dostavljaju bakteriološkoj laboratoriji.

Za vreme prenošenja i čuvanja materijala spoljna temperatura ne šteti bakterijama ukoliko transport ne traje duže od 6 časova. Ako postoji mogućnost da se u materijalu nađu bakterije osetljive na hladnoću (meningokok ili gonokok) preporučljivo je stavljanje posude sa materijalom u priručnu termos bocu koja bi održavala temp. oko 37 °C. Kod dužeg transporta može doći do promene u biološkim osobinama i međusobnim odnosima bakterija usled novih uslova života. Ove promene se mogu izbeći dodavanjem materijalu pufera, glicerola, FR ili bujona. Po pravilu, materijal se uzima pre davanja bolesniku nekog hemoterapijskog sredstva.

55. Bris, uzimanje materijala iz guše, nosa i nazofarINKSA

Bris je drveni štapić dužine 18-20cm oko čijeg prednjeg kraja je namotana vata. Svaki bris se stavi u posebnu epruvetu koja se dobro zatvori zapušaćem od vate i zatim sterilise vrelim vazduhom. Koristi se za uzimanje sekreta iz guše, nosa, nazofarinka, oka, uva, sekreta iz rana...Brisom se takođe mogu uzeti gnoj, feces, različiti materijali za vreme operacije kao i tokom obdukcije.

Uzimanje materijala iz guše - najvažnije je da se materijal pažljivo skine sa promenjenih mesta. Bris treba obrnati oko osovine da vata bude sa svih strana natopljena materijalom. Prilikom uzimanja treba paziti da se vata ne kontaminiše mikroorganizmima normalne flore usne šupljine. Pacijent sedi okrenut izvoru svetlosti, dobro otvori usta, ispruži jezik i duboko udiše vazduh. Stručno lice špatulom držeći je u levoj ruci, blago pritisne zadnji deo jezika, uzima materijal, bris vraća u epruvetu i šalje u bakteriološku laboratoriju.

Uzimanje materijala iz nosa- Prilikom uvlačenja u nos, paziti da vata ne dotakne ivice otvora i zidove atrijuma. Zato je najbolje bris uzimati kroz nosni spekulum. Bris se najčešće uzima između ispod i iznad donje nosne školjke.

Uzimanje materijala iz nazofarINKSA- Sekret iz nazofarinka se uzima brisom kroz usta ili kroz nos. Ako se uzima kroz usta, iza resice, prednji kraj držača, oko koga je namotana vata, mora biti lako savijen. Za uzimanje brisa kroz nos upotrebljava se tanka i savitljiva žica oko čijeg prednjeg dela je namotana vata. Ona se uvuče u nos kroz nosni spekulum i oprezno gura sve dublje dok se ne oseti otpor. Zatim se vatom, koja se stalno obrće protrlja sluzokoža nazofarinka i na isti način lagano izvuče, odmah stavi u epruvetu i šalje u laboratoriju.

Materijal iz slušnog kanala ili srednjeg uva posle perforacije bubne opne uzima se tankim brisom koji se uvuče kroz sterilan levak.

56. Koprokultura

Koprokultura je mikrobiološki pregled uzorka stolice (feces) sa ciljem identifikacije patogenih bakterija koje mogu biti uzročnik učestalih stolica. Uzročnici dijareje: bakterije (salmonele i šigele), virusi (rotavirusi, enterovirusi), gljivice (*candida albicans*), parazit, metabolički poremećaji. Bakterije su najčešći izazivači crevnih infekcija unošenjem kontaminirane hrane i zaražene vode. Mikrobiološkom analizom stolice se utvrđuje prisustvo ovih bakterija i ispituje njihova osjetljivost na antibiotike. Po prestanku simptoma bolesti bakterije se i dalje mogu izlučivati putem stolice (kliconostvo). Pre stupanja u kolektiv ovi pacijenti moraju imati tri uzastopne negativne koprokulture. Crevne bakterije su otporne u spoljnoj sredini. Gljivice se mogu pojaviti u stolici usled dugotrajne upotrebe antibiotika.

Stolica za koprokulturu se uzima u minimalnoj količini u sterilnu bočicu u kojoj se nalazi kašičica. Feces se uzima sa različitih mesta na kojima se vidi promena (gnoj, sluz, krv). Potrebno je pregledati njmanje tri uzastopna uzorka stolice da bi se potvrdilo ili isključilo prisustvo patogenih bakterija.

57. Urinokultura

Kultivisanje mokraće na hranjivim podlogama je **urinokultura**.

Test koji otkriva i identificuje bakteriju koja može da bude uzrok infekcije urinarnog trakta. Za bakteriološki pregled, uzima se jutarnji urin. Uzorak se skuplja u čistu bočicu i čuva u uslovima koji omogućavaju rast bakterija. Ako bakterija ne raste test je negativan. Tip bakterije se identificuje mikroskopom ili hemijskim testovima.

Uzorak ne sme duže od dva sata biti na sobnoj temperaturi (na +4, 24 časa).

Rutinski pregled urina se sastoji iz 3 dela:

1. Opis fizičkih i fizičko hemijskih karakteristika mokrace: izgled, boja, miris, reakcija, specifična težina;
2. Hemijska analiza- na proteine, šećer, ketonska tela, urobilinogen, bilirubin i nitrite;
3. Pregled sedimenta, tj. mikroskopski pregled taloga koji se dobija nakon centrifugiranja urina.

58. Bilikultura

Žuč se uzima duodenalnom drenažom ili u toku operativnog zahvata. Žuč dobijena drenažom se stavlja u sterilnu epruvetu i tako šalje na bakteriološki pregled. Kultivisanje žuči na hranjivim podlogama naziva se **bilikultura**.

59. Hemokultura

Hemokultura je razmnožavanje bakterija iz krvi na hranjivim podlogama u cilju izolacije i identifikacije mikroorganizama. Uzeta krv se odmah zasejava. Pri uzorkovanju poštovati uslove asepse. Podloge se inkubiraju 10 dana pod aerobnim i anaerobnim uslovima.

60. Obrada materijala

Svaki ispravno uzet materijal se dostavlja u laboratoriju obrađuje se određenim sistemom koji obuhvata sledeće postupke: pravljenje direktnog mikroskopskog preparata, zasejavanje na hranjive podloge i inokulisanje ispitivanog materijala osetljivoj laboratorijskoj životinji (po potrebi).

Direktan mikroskopski preparat **nativan** ili bojen se koristi kao predhodna orijentacija mikrobnog pejzaza u ispitivanom materijalu.

(Gde se inkubira zasejani materijal u bakteriologiji i na kojoj temperaturi?)

Za zasejavanje materijala se koriste standardne hranjive podloge. Materijal se zasejava na veći broj hranjivih podloga da bi se kultivisanje bavilo istovremeno pod aerobnim, anaerobnim i mikraerofilnim uslovima. Materijal se inkubira na 35 do 37°C u termostatu. Za većinu aerobnih bakterija vreme inkubiranja iznosi 18-24 časa, za anaerobne i mikraerofilne 48-72 časa, dok se za neke bakterije npr. bacil tuberkuloze treba inkubirati 2-10 nedelja na Lowenstein-ovoj podlozi pod aerobnim uslovima.

(Šta je čista a šta mešana kultura?)

Patogeni mikroorganizmi u prirodnim uslovima žive, razvijaju se i deluju udruženi sa drugim patogenim i saprofitnim bakterijama. Veoma često u toku kultivisanja u ispitivanom materijalu nalaze se isto tako udružene. Takav rast gde na hranjivoj podlozi izrastu dve ili više bakterijskih vrsta naziva se **mešana kultura**. Ako u materijalu postoji samo jedna bakterijska vrsta, kultivisanjem na hranjivoj podlozi izrasta **čista kultura**.

Za ispitivanje i identifikovanje bakterija neophodno je raditi uvek sa čistom kulturom. Iz mešane kulture se može izdvojiti čista kultura presejavanjem jedne kolonije na drugu hranjivu podlogu.

Kolonija je formacija na čvrstoj hranjivoj podlozi vidljiva golim okom, koja je nastala razmnožavanjem jedne jedine bakterijske ćelije.

Čista kultura je skup kolonija jedne bakterijske vrste na čvrstoj hranjivoj podlozi.

Mešana kultura je skup kolonija dve ili više bakterijskih vrsta na čvrstoj hranjivoj podlozi.

Osetljive laboratorijske životinje koriste se za primarno izolovanje nekih bakterija npr. bacil tuberkuloze direktno iz bolesničkog materijala. Inokulisanje životinje treba observirati (kontrola težine, temperature) da bi se utvrdilo da li je došlo do obolenja, ili ubrizgani materijal nije dao očekivane promene kod laboratorijske životinje.

61. Šta je antibiogram i kako se predstavljaju rezultati?

Antibiogram služi za ispitivanje osetljivosti bakterija prema antibioticima. Za ispitivanje antibiograma u upotrebi su sledeći bakteriološki metodi: difuzioni i dilucioni.

Difuzioni metod se može primenjivati na različite načine: disk metoda, pastila, izdubljenog agara, staklenih cilindara, kanalica.

Na hranjivu podlogu u Petri kutiji predhodno se zaseje kultura uzročnika u ciju osetljivosti prema dejstvu različitih antibiotika koje hoćemo da ispitamo. Zatim se stavljuju standardni diskovi od filter hartije impregnirani određenim količinama antibiotika. Efekat se ispoljava u inhibiciji raščenja bakterija u krugu oko izvora antibiotika iz koga on difunduje u okolnu podlogu. Veličina prečnika zone inhibicije služi kao merilo dejstva antibiotika. Rezistentne kolonije će rasti nesmetano oko kružica.

0- <15mm- rezistentan, 16-24mm- slabo osetljiv, 25-34mm- umereno osetljiv, >-35mm- jako osetljiv.

Dilucioni metod- Upotrebljava se za određivanje osetljivosti bakterijskih loza prema antibioticima i za ispitivanje aktivnosti antibiotika u telesnim tečnostima u toku terapije.

Pripreme se dvostruka razblaženja antimikrobijskog agensa rastvorenog u bujonu u nizu epruveta. Ovde se uključuje kontrolna epruveta koja ne sadrži antibiotik. Svakoj epruveti se doda puna eza kulture mikroorganizama inkubirane preko noći.

Epruvete se inkubišu preko noći u toku 18-24 časa na 37°C i ispituje zamućenje. Titar je prva epruveta sa najmanjom koncentracijom antibiotika koja još sprečava rast. Epruveta sa najvećim razblaženjem koja ne pokazuju vidljivo zamućenje je najmanja inhibitorna conc. ili bakteriostatička koncentracija. *Bakteridna koncentracija* je ono najveće razblaženje antibiotika koje ne pokazuje rast prilikom preselenja.

62. Metode bojenja bakterija- podela

Bojenje bakterija je jedna od metoda identifikacije, a ponekad i jedina metoda (lepra) ili najčešća (gonokok).

Bojenje nam služi da se uoči oblik, veličina i raspored bakterija, kao i za uočavanje njihove strukture, naročito postojanje kapsule, spore, flagela. Po poreklu boje mogu biti:

Prirodne boje- dobijaju se ekstrakcijom iz biljaka i životinja, ali su zbog komplikovanog načina dobijanja vrlo skupe (safranin, indigo, karmin).

Veštačke boje- dobijaju se pri destilaciji katrana kamenog uglja, i nazivaju se anilinske boje. Boje su po hemijskom sastavu soli koje imaju dva jona. Jedan se zove hromofor i nosilac je boje. Drugi jon je auksohrom i omogućuje hemijsku reakciju između hromofora i sastavnih delova bakterijskih ćelija.

Bakteriološke boje mogu biti *kisele, alkalne i neutralne*. Kisele boje su eozin, kiseli fuksin i vezuvin. One imaju afinitet za protoplazmu. Alkalne boje su metilensko plavo, gencijana violet. Služe za bojenje nuklearnog ekvivalenta.

Mehanizam bojenja- fizički i hemijski.

Fizički proces se sastoji u apsorpciji i difuziji boja u ćeliju.

Hemijski proces se sastoji u hemijskoj reakciji između boje i jedinjenja u bakteriološkoj ćeliji.

Bojenja koja se koriste u bakteriologiji mogu biti prosta i složena.

Prosta bojenja su takva da se za bojenje koristi jedna boja, najčešće metil plavo ili karbol fuksin. Takvo bojenje može biti *monohromatsko i metahromatsko*.

Monohromatsko je takvo bojenje da je cela bakterijska ćelija ravnomerno i jednakom obojena (bojenje metilenskim plavim).

Metahromatsko je takvo bojenje da se razne strukture ćelija oboje različito (protoplazma jednom a jedro drugom bojom).

Složena bojenja su takva da se koriste dve ili više boja. Mogu biti *diferencijalna i specijalna*.

Diferencijalna bojenja služe za razlikovanje određenih grupa bakterija u zavisnosti od njihovog hemijskog sastava. Npr. bojenjem po Gram-u razlikujemo Gram pozitivne od Gram negativnih bakterija.

Specijalna bojenja- Koriste se za bojenje struktura bakterijskih ćelija kao što su: kapsule, spore, flagele, metahromatske granule.

63. Pravljenje preparata za bojenje

Svaki materijal koji treba da se boji prvo se stavlja sterilnom ezom na mikroskopsku pločicu. Zatim se ezom napravi tanak razmaz. Preparat se suši na vazduhu da, pri fiksiranju plamenom, ne bi došlo do promena morfoloških oblika. Osušen preparat fiksira se na plamenu tako što se donjom stranom mikroskopske pločice tri puta prelazi preko plamena. Fiksiranje se vrši zbog toga što sa jedne strane prekidamo enzimske funkcije mikroorganizama, a takođe omogućavamo da bakterije bolje prionu za mikroskopsku pločicu i ne speru se prilikom bojenja. Posle toga preparat se boji. Osuši se filter papirom i stavi kap imerzionog ulja. Mikroskopira se imerzionim objektivom.

64. Bojenje po Gram-u

Ovo bojenje je:

- *diferencijalno* (razlikuju se Gram pozitivne od Gram negativnih bakterija);
- *progresivno* (prvo se boji jednom pa drugom bojom);
- *regresivno* (bakterije se odboje pa se drugom bojom boje).

Napravljen i fiksiran preparat boji se po Gram-u na ovaj nacin:

- karbol gencijana violet (1-2 minuta zavisno od debljine preparata);
- Lugolov rastvor (30 sekundi);
- 96% alkohol (ispirati dok se sliva ljubičasta boja);
- isprati vodom;
- Karbol fuksin (1-2 minuta);

Isprati vodom, osušiti, staviti kap imerzionog ulja i posmatrati imerzionim objektivom.

Ovim načinom bojenja razlikujemo Gram pozitivne bakterije obojene ljubičasto sa karbol gencijana violet i Gram negativne, obojene crveno sa karbol fuksinom.

65. Na šta ukazuje nalaz *Escherichia-colis* i *Enterococcus fekalis* u uzorku brisa radne površine?

Fiziološku floru donjih delova crevnog trakta (kolona) čine anaerobne bakterije. Od fakultativno anaerobnih bakterija koje se lako izoliju na standardnim bakteriološkim podlogama dominiraju tzv. koliformne bakterije od kojih je najbrojnija *Escherichia coli*, a tu su i *Erwínia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* *Proteus*, kao i Gram pozitivne koke - *Enterobacter spp.* **Nalaz ovih bakterija u brisevima ruku ili površina ukazuju na fekalnu kontaminaciju.**

66. Navedite bakterije koje čine deo fiziološke flore kože?

Fiziološka flora kože sadrži oko 100 različitih bakterijskih vrsta i zavisi od brojnih fizioloških ili ekoloških uslova. U sastavu fiziološke flore dominiraju Gram pozitivne koke kao što su *Propionilbacterium acnes* ili *Staphylococcus epidermidis* (ili **koagulaza negativan Staphylococcus spp.**), ***Streptococcus viridians***, *Micrococce*, kao i Gram pozitivni bacilli – difteroidi, ali mogu se naći i Gram negativni bacilli kao što su *Proteus spp.* ili kvasnice kao *Candida spp.* (naročito na pregibima kože).

67. Nabroj 5 osnovnih frakcija proteina koji se dobijaju elektforetskim razdvajanjem?

Elektforeza je metoda kojom se proteini razdvajaju na osnovu elektforetske pokretljivosti (izoelektričnog potencijala). Osnovne frakcije proteina su albumin, α 1, α 2, β , i γ globulini.

68. Organizacija rada u patohistološkoj laboratoriji

U patohistološkoj laboratoriji se obrađuju uzorci tkiva uzetih od živih pacijenata (biopsija), ili sa leševa (autopsija) kao i isečci tkiva eksperimentalnih životinja koji se koristi u istraživačke svrhe. Osnovni zadatak laboratorije je da uzorak tkiva pripremi za analizu tj. za postavljanje dijagnoze oboljenja čoveka kome tkivo pripada.

Priprema tkiva za analizu se sastoji u nizu postupaka koji se zovu **histološka tehnika**. Pomoću nje se tkivo prvo fiksira tako da bi se očuvale njegove osnovne osobine, prožima posebnim materijalima koji ga očvršćuju, nakon čega se tkivo reže u tanke lističe. Tkivo se može i smrznuti i rezati u tanke rezove (metoda *ex tempore*). Rezovi tkiva se boje različitim bojama koje omogućavaju razlikovanje detalja (jedra se boje različito od citoplazme, kao i granule, pigmenti, vlakna) što omogućava analizu tkiva. Kada se završi bojenje, tanki rezovi se uklapaju u prozračnu supstancu.

Krajnji cilj histološke tehnike je stvaranje histološkog preparata koji pregleda specijalista patolog i daje dijagnozu. Analiza se vrši mikroskopski jer rezovi moraju biti tanki, uklopljeni u supstancu koja propušta svetlost i to između predmetnog i pokrovног stakla.

Patohistološka dijagnoza se sastoji iz dva dela:

Detaljan mikroskopski opis primjenjenog materijala i mikroskopski nalaz, dijagnoza.

69. Šta se koristi za rezanje parafinskih kalupa (blokova)?

Za rezanje parafinskih kalupa se koristi **mikrotom**. Mikrotom je aparat kojim se tkivo reže na tanke rezove (od 1 mikrona na dalje). Konstruisani su na osnovu dva tipa: klizni i rotirajući.

Mikrotom za rezanje smrznutog tkiva je *kliznog tipa*. Koristi se u slučajevima za potrebe hitne dijagnostike.

Kriostat je izolovana komora u koju je ugrađen *rotirajući tip mikrotona*. U komori se održava niska temperatura, -20 do -30°C tako da su nož i tkivo na istoj, niskoj temperaturi (sprečava se stvaranje kristala čime se oštice tkivo).

Klizni mikroton ima nož koji klizi u posebnom ležištu, a blok tkiva je nepokretan i automatski se podiže prema nožu za željeni broj mikrona.

Rotirajući tip mikrotoma ima nož koji je nepokretan, a blok tkiva se kreće preko oštice noža.

70. Papanicolau, PAP, PAPA test

Papanikolau test, ponekad nazivan PAP test, PAPA test ili cervicalni citološki pregled, je jednostavna dopunska dijagnostička metoda kojom se mogu otkriti abnormalne ćelije u grliću materice. On omogućava ranu dijagnozu, tj. **rano otkrivanje premalignih promena i karcinoma grlića materice**. Ginekolog specijalnim drvenim štapićem (na čijem se jednom kraju nalazi komadić vate), ili četkicom uzima uzorak materijala za citološki pregled sa prednje i zadnje usne grlića materice i iz kanala grlića materice. Od uzorka se pravi citološki razmaz (ćelije grlića materice se razmažu po predmetnom staklu i boje specijalnim bojama) u kojem se pod mikroskopom gledaju znaci zapaljenja grlića materice, uzročnici infekcije, dobroćudne i zloćudne ćelije i druge promene.

Nalazi se prezentuju u pet grupa

- **PAPA I** - uredan nalaz
- **PAPA II** - netipične zapaljenjske promene
- **PAPA III** - displazija: blaga, srednje teška ili teška
- **PAPA IV** - karcinom in situ
- **PAPA V** - sumnja na invazivni karcinom.

Postoji i Betezda (*Bethesda*) klasifikacija, koja uključuje i opisnu dijagnozu.

Klasifikacija citološkog nalaza prema Papanikolau i Bethesda Sistemu klasifikacije

I	NILM	Normalan nalaz
II	NILM	Negativno na intraepitelnu leziju i malignitet, nepromenjene ćelije, negativno na rak, normalan nalaz.
III	ASCUS	Atypične skvamozne ćelije neodređenog značaja, u prilog reaktivnim promenama u prilog displaziji
a	ASCH	
III	L-SIL(CIN1)	
b	H- SIL(CIN2,3)	Upućuje na premaligne promene
IV	H- SIL	Malobrojne ćelije raka
	AIS	
V	Invazivni karcinom	Brojne ćelije raka

Pitanja pripremila : Tanja Stamatović

Literatura:

- Hematologija sa transfuziologijom za srednju medicinsku školu, Zoran, Slobodan i Milosav Ristić
- Laboratorijska hematologija, Miroljub Petrović, Beograd 2002

- Medicinska biohemija 1, Nada Majkić Singh
- Mikrobiologija sa parazitologijom i epidemiologijom, Spiro Radulović
- Mikrobiologija sa parazitologijom-praktikum, za studetne medicine, Doc.dr B. Bandut, Doc.dr A.. Janković Brmbolić, Asist O. Berger Jekić, asist.dr Lj. Šćepan, Asist.dr s. Jovanović Zmijanac, Asist.dr Lj. Marković, Dr V.Leposavić, Mgph M.Nedeljković
- Patološka histologija, dr. Sci med. Radojka Bokun

