ՀՏԴ 577.12 *Կենսաբանություն*

ԳԼՅՈՒԿՈԶԻ ՈՐՈՇՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿԱԿԻՑ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ ԱՐՅԱՆ ՇԻՃՈՒԿՈՒՄ ԵՎ ՄԵԶՈՒՄ

Ա.Լ.Գրիգորյան, Հ.Զ.Մինասյան

Գլյուկոզի խտության որոշումը արյան մեջ կլինիկական ախտորոշման լաբորատորիայում (ԿԱԼ) հաճախակի կատարվող կենսաքիմիական հետազոտություններից մեկն է ածխաջրատային փոխանակության խանգարումները բացահայտելու համար: Գլյուկոզի բնականոն քանակությունը հասուն առողջ մարդու արյան մեջ տատանվում է 3,3–6,6 մմոլ/լ կամ 60–100 մգ% սահմաններում: Արյան մեջ գլյուկոզի քանակի բարձրացման դեպքում առաջանում է ծանր հիվանդություն՝ շաքարախտ (դիաբետ), որը պայմանավորված է ենթաստամոքսային գեղձի՝ β-բջիջների արտազատվող հորմոնի՝ ինսուլինի, և վահանագեղձի՝ T_3 և T_4 հորմոնների քանակությունից և այլ գործոններից: Շաքարախտը 21-րդ դարի ամենատարածված և ամենահուզող հիվանդություններից մեկն է: Այդ հիվանդությունը ունի շատ հին պատմություն: Դիաբետի մասին նկարագրությունններ կան 5-րդ դարից սկսած: Տվյալ հիվանդությունը բացահայտելու համար կարևոր է ժամանակին որոշել շաքարի քանակությունը արյան մեջ, որի բացահայտման համար մի շարք մեթոդներ կան:

Գլյուկոզի որոշման բացարձակ ճանաչվածության պատճառը կապված է տվյալ հիվանդությամբ տառապող մարդկանց թվաքանակի մեծացման հետ: Ուստի գլուկոզայի քանակությունը կարելի է որոշել ինչպես ստացիոնար, պոլիկլինիկական, այնպես էլ տնային պայմաններում, քանի որ առանց այդ տեղեկատվության հիվանդների համար դժվար է ճշտել սննդակարգը, ֆիզիկական ծանրաբեռնվածությունը, ինսուլինի և ուրիշ շաքար իջեցնող միջոցների օգտագործումը:

Կենսաքիմիական անալիզների որակը պայմանավորված է նրա ճշտակատարումից, չափիչ ամանեղենի մաքրությունից, կատարման ճշգրտությունից, օգտագործվող սարքերի որակից, ռեակտիվների մաքրությունից, աշխատողների որակավորումից և այլն:

Տեսթի բացարձակ նշանակությունը և մեծ ծավալով կատարվող հետազոտությունները նպաստեցին արյան մեջ գլյուկոզայի որոշման համար տարբեր տիպի բարդ սարքավորումների և մեթոդների ստեղծմանը և մշակմանը:

Տվյալ հոդվածի շրջանակներում թվարկենք, ուսումնասիրենք և վերլուծենք ամենաժամանակակից կիրառական և միաժամանակ պարզ մեթոդները:

1. <u>Ռեդուկտոմետրիկ մեթոդ:</u> Համարյա չի օգտագործվում: Հիմնված է ածխաջրերի վերականգնող հատկության վրա:

1.1. Հագեդոռնի և Իենսենի մեթոդ (ծավալային անալիզ, 1923 թ.), որը հիմնված է երկաթի կարմիր աղի՝ $K_3[Fe(CN)_6]$-ի վերականգվելու վրա շաքարների ազդեցությամբ: Սակայն արյան մեջ բացի շաքարներից կան նաև ուրիշ նյութեր՝ միզաթթու, գլյուտաթիոն, կրեատինին, վիտամին C, որոնք կարող են վերականգնել նշված աղը:

1.2. Ֆոլինի և Ուի մեթոդը (1919թ.). նույնպես վերականգնողական մեթոդ է, սակայն հիմնված է ոչ թե տիտրացիայի, այլ կոլորիմետրիայի (գունաչափման) վրա:

Այս մեթոդները անհարմար և թունավոր են, օժտված են ցածր ճշգրտությամբ, ուստի նրանց վրա մենք կանգ չենք առնի:

1.3. Վերոնշված մեթոդներից բացի, մեզում գլյուկոզայի քանակության որոշման համար գոյություն ունի Ֆելինգի մեթոդ, որն ամենից պարզն է և ամենակիրառականն է: Կատարման կարգը հետևյալն է՝ 0,4 մլ մեզին ավելացվում է 5 մլ Ֆելինգի ռեակտիվ (NaOH, $CuSO_4$, սեգնետյան աղ՝ գինեթթվի Na-K-ական աղ), լավ խառնվում է, հետո թույլ կրակի վրա տաքացվում է վերևի մասից: Կախված շաքարի քանակությունից, մեզը ստանում է տարբեր գունավորում: Մասնավորապես 0,1-0,5% (0,02մմոլ/լ) շաքար պարունակող մեզը ստանում է կանաչ գունավորում, իսկ 1,5% (0,1 մմոլ/լ) դեպքում՝ դեղին գունավորում, իսկ ավել շաքար պարունակվելու դեպքում ստացվում է թափանցիկ լուծույթ նարինջագույն նստվածքով:

Ի գիտություն, առողջ մարդու մեզի մեջ ածխաջրատները (գլյուկոզա, ֆրուկտոզա և այլն) բացակայվում են:

2. **<u>Ֆերմենտային մեթոդ:</u>**

2.1. Գլյուկոզոօքսիդազային մեթոդ

Այսօր արյան մեջ գլյուկոզի խտության որոշման համար լաբորատոր պրակտիկայում գոյություն ունեն լայն կիրառվող մի քանի գլյուկոզոօքսիդազային մեթոդներ՝

2.1.1. Ֆոտոմետրիա ըստ վերջնային կետի

2.1.2. Ֆոտոմետրիկ կինետիկական մեթոդ

2.1.3. Արտացոլող ֆոտոմետրիա՝ «չոր քիմիա»

2.2. Հեքսոկինազային մեթոդ

2.3. Գոլդմանի կողմից ձևափոխված (1962 թ.) օրտոտոլոիդային վերականգման կոլորիմետրիկ մեթոդ, ավելի ճշգրիտ և յուրահատուկ, որի միջոցով հնարավոր է որոշել գլյուկոզան միայն մեզում:

<u>Գլյուկոզոօքսիդազային մեթոդ:</u> Այսօր ամենա մեծ տարածումը ունի գլյուկոզոօքսիդազապերօքսիդազային մեթոդը, որը մեծ կիրառություն է գտել ԼՂՀ ախտորոշիչ կենտրոնում, հիվանդանոցների և պետական համալսարանի կենսաքիմիայի լաբորատորիայում: Մեթոդը հիմնված է գլյուկօքսիդազային ռեակցիայի վրա՝

$$\text{Գլյուկոզա} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{գլյուկոզոօքսիդազա}} \text{գլյուկոնաթթու} + H_2O_2$$

Գլյուկոզոօքսիդազան գլյուկոզայի առաջին ածխածնային ատոմից պոկում երկու ջրածնային ատոմները և փոխանցում հեղուկ ռեակտիվում լուծված թթվածնի, որի արդյունքում առաջանում է համարժեք քանակությամբ ջրածնի պերօքսիդ՝ H_2O_2: Նրա քանակությունը ուղիղ համեմատական է որոշվող գլյուկոզի խտությանը:

Ստացված ջրածնի պերօքսիդի մոլեկուլները պերօքսիդազա ֆերմենտի ազդեցության տակ ճեղքվում են թթվածնի ակտիվ ձևի՝ անիոն-ռադիկալի (գերօքսիդ) $O_2^{\bullet-}$-ի, որն իր հերթին օքսիդացնում է քրոմոգենը՝ (4-ամինաֆենազոն, ֆենոլ) առաջացնելով քինոլինային ներկ և կլանման սպեկտրի զգալի փոփոխություն:

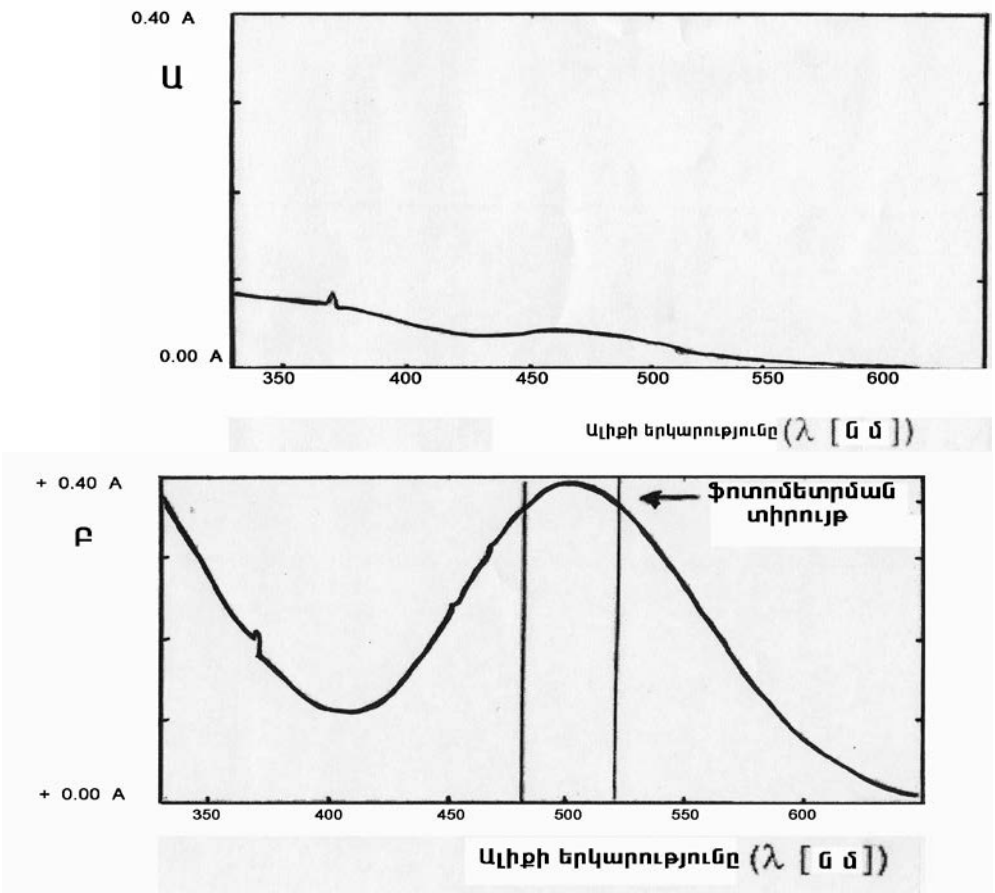
$$H_2O_2 + \text{4-ամինոֆենազոն} + \text{ֆենոլ} \xrightarrow{\text{պերօքսիդազա}} \text{քինոնիմինային ներկ} + H_2O$$

Անալիզը կատարվում է ըստ հետևյալ սխեմայի՝

	Մակրո			Կիսամիկրո		
Կյուվետի պարունակությունը	Հաստատուն	Փորձանմուշ	Ստուգիչ	Հաստատուն	Փորձանմուշ	Ստուգիչ
Հաստատուն	20 մկլ 0,02 մլ	20 մկլ 0,02 մլ	–	10 մկլ 0,01 մլ	10 մկլ 0,01 մլ	–
Փորձանմուշ	20 մկլ 0,02 մլ	20 մկլ 0,02 մլ	–	10 մկլ 0,01 մլ	10 մկլ 0,01 մլ	–
Ռեակտիվ	2000 մկլ 2 մլ	2000 մկլ 0,02 մլ	2000 մկլ 2 մլ	1000 մկլ 1 մլ	1000 մկլ 1 մլ	1000 մկլ 1 մլ
Պարունակությունը խառնել, պահել 10 րոպե 20 – 25°C-ում, կամ 5 րոպե 37°C-ում: Կլանման չափումը կատարել 60 րոպեի ինթացքում (dA):						

Փորձի կատարման ժամանակ գիտաշխատողը պետք է անպայման հաշվի առնի ստուգիչի ընտրումը, քանի որ նա նույնպես ունի իր սեփական կլանման սպեկտրը:

Համապատասխան երկարությամբ ալիքը որոշելու նպատակով չափվում են աշխատանքային լուծույթների կլանման սպեկտրները մինչ գլյուկոզի լուծույթի մտցնելը (Ա) և մտցնելուց հետո (Բ): Պարզվում է՝ ռեակցիոն խառնուրդի (ռեակտիվ+գլյուկոզա) կլանման մակսիմումը (D_{max}) գտնվում է 500 նմ տիրույթում: Ակնհայտ է, վերջնական ռեակցիայի օպտիկական խտության փոփոխությունը 480 – 520 նմ ալիքի երկարության տիրույթում ուղիղ համեմատական է փորձանմուշում պարունակվող գլյուկոզի խտությանը:



Նկար 1. Աշխատանքային լուծույթների կլանման սպեկտրները մինչ գլյուկոզի լուծույթի մտցնելը (Ա) և մտցնելուց հետո (Բ):

ՖԷԿ-ով չափումը կատարել 540 նմ տիրույթում, կապույտ լուսազտիչով, 1 սմ հաստություն ունեցող կյուվետով, ըստ ընտրված ալիքի երկարության: Շաքարի քանակությունը հաշվել ներքոհիշյալ բանաձևերի միջոցով՝

$$C = 100 * \frac{dA\ (\text{նմուշ})}{dA\ (\text{ստանդարտ})}\ [\text{մգ/դլ}] \text{ կամ } [\text{մգ\%}]$$

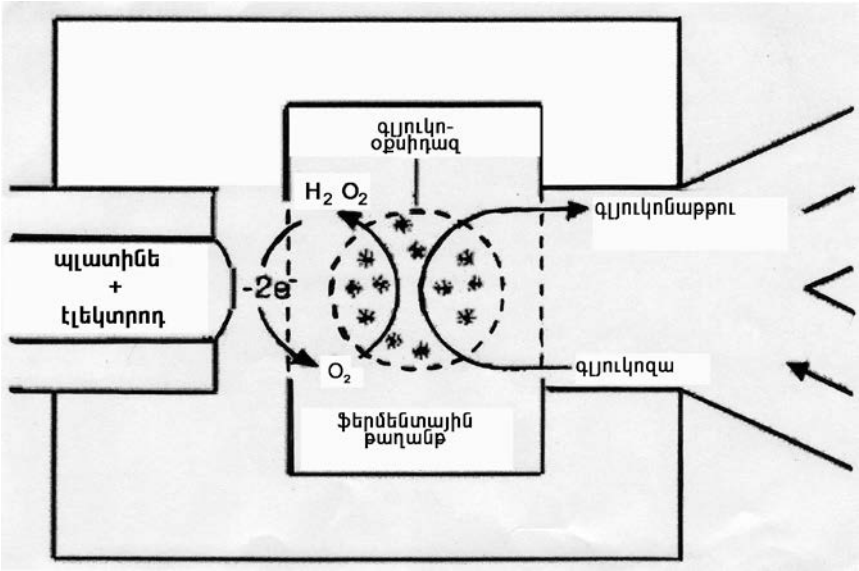
$$C = 5.55 * \frac{dA\ (\text{նմուշ})}{dA\ (\text{ստանդարտ})}\ [\text{մմոլ/լ}]:$$

Գլյուկոզի որոշման տվյալ մեթոդի լայնորեն ճանաչվածությունը բացատրվում է նրա բարձր յուրահատկությամբ և հստակ կատարմամբ: Մեթոդը կարելի է իրացնել ինչպես սովորական ֆոտոմետրով (առավել լավ է՝ *Микролаб 540* տիպի մասնագիտացված կենսաքիմիական ֆոտոմետրը), այնպես էլ կենսաքիմիական ինքնաանալիզատորներով: Գլյուկօքսիդազա-պերօքսիդազային մեթոդը այսօր համարվում է գլյուկոզի քանակության որոշման ամենա ճշգրիտ մեթոդներից մեկը: Որպես կենսաբանական նմուշ օգտագործվում է ինչպես արյան շիճուկը, այնպես էլ ամբողջական արյունը: Վերջինիս հետ աշխատելու դեպքում անհրաժեշտ է հաշվի առնել այն փաստը, որ մազանոթային արյան մեջ շիճուկի (պլազմայի) բաժինը կախված է հեմատոկրիտի մեծությունից, ինչը կարող է բացասական ազդել արդյունքի ճշտության վրա: Այդ պատճառով այս մեթոդով գլյուկոզայի որոշման ժամանակ նախընտրելի է օգտագործել հետազոտվողի արյան շիճուկը:

Ֆոտոգունաչափման մեթոդի հետ մեկտեղ մի քանի տարի առաջ ի հայտ եկան հավաքածուներ, որոնցում իրացված են **ֆոտոմետրման կինետիկ մեթոդը**: Այդ մեթոդի առավելությունը նրանում է, որ արդյունքը կախված չէ փորձանմուշում այլ միացությունների առկայությունից, քանի որ վերջիններիս կլանման սպեկտրը ժամանակի ընդացքում կայուն է, որը պահանջում է կինետիկ ֆոտոմետր (օրինակ *Stat Fax 1904+, Stat Fax 3300*), կիսաավտոմատիկ անալիզատորներ (օրինակ, *Clima 15*), կամ ավտոմատիկ անալիզատորներ: Ամբողջական արյան

գլյուկոզի խտության որոշումը հարմար է իրականացնել այնպիսի սարքերով (օրինակ, գլյուկոմետրով), որոնց աշխատանքը հիմնված է **ամպերոմետրիկ չափման** սկզբունքի վրա կամ էլ ըստ հատուկ ֆերմենտային տվիչի: Չափման հիմքում ընկած է գլյուկօքսիդազապերօքսիդազային ռեակցիան: Ջրածնի պերօքսիդը համարվում է անկայուն քիմիական միացություն, որը կարող է ծառայել որպես լիցքավորված մասնիկների աղբյուր: Այն օգտագործվում է թաղանթային տիպի ֆերմենտային տվիչի կամ դյուրատար (պորտատիվ) գլյուկոմետրների էլեկտրաքիմիական մարտկոցներում:

Հոսանուտ չափիչ խորշում գտնվում է մի կողմից ֆերմենտային թաղանթով սահմանափակված չափիչ խորշը:



Նկար 2. Չափիչ խորշ:

Մոտ 60 միկրոն հաստություն ունեցող թաղանթի վրա հատուկ ձևով ադսորբված է

գլյուկոզոօքսիդազան, իսկ թաղանթի մյուս կողմից նրան սեղմված՝ պլատինային էլեկտրոդը:

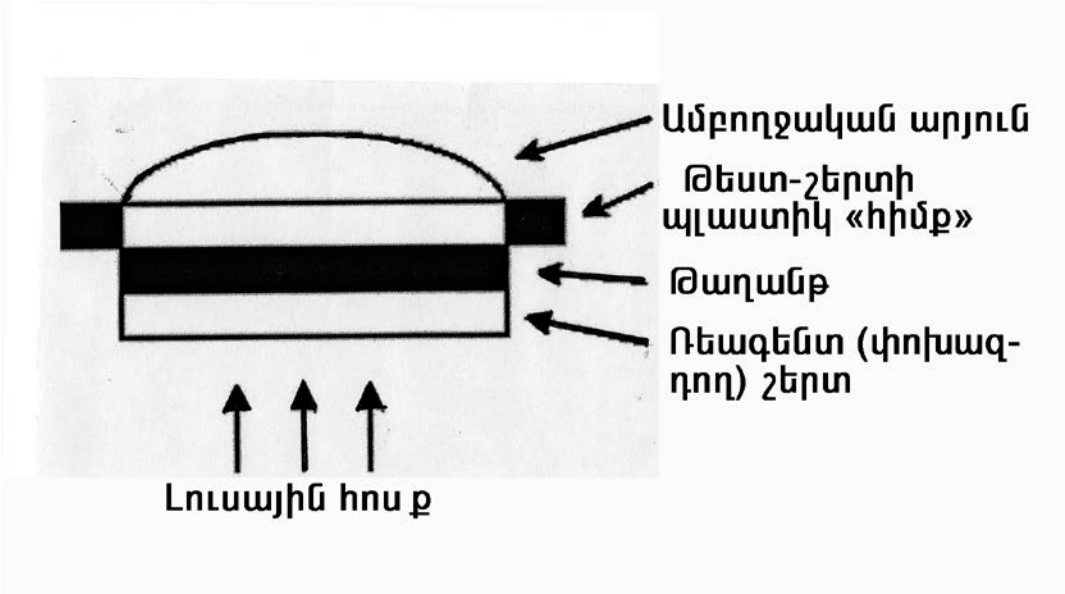
Ամբողջական արյան փորձանմուշը (սովորաբար 20 մկլ կամ 0,02 մլ) նոսրացվում է բուֆերային լուծույթով (էրիթրոցիտները քայքայվում են), ինչից հետո այն ուղղվում է դեպի հոսանուտային խորշ:

Գլյուկոզան մեմբրանի վրա գտնվող գլյուկոզոօքսիդազա ֆերմենտի ազդեցության տակ ենթարկվում է օքսիդացման: Առաջացած ջրածնի պերօքսիդը դիֆուզվում է թաղանթի միջոցով և հետո պլատինի ազդեցության տակ օքսիդանում: Պլատինի մակերեսի վրա ջրածնի պերօքսիդի նստումը ձևավորում է H_2O_2-ի մոլեկուլների քանակությանը համարժեք հոսք: Սարքի կողմից ստացված ազդանշանը համապատասխանում է լարման արժեքին, որն էլ ուղիղ համեմատական է փորձանմուշում գլյուկոզի քանակությանը:

Վերոնշված մեթոդով աշխատող սարքերը կոչվում է գլյուկոզայի ավտոմատիկ անալիզատոր՝ (օրինակ *Biosen* (Գերմանիա)): Այն հարմարավետ են պոլիկլինիկաներում օգտագործման համար, քանի որ գլյուկոզի որոշման համար հիմնականում վերցվում է մազանոթային արյունը:

Կլինիկական լաբորատոր ախտորոշման մեթոդների զարգացման կարևոր էտապ է հանդիսացել «չոր քիմիայի» ի հայտ գալը: Բնական է, որ այդ տեխնոլոգիայի առաջին խնդիրներից մեկն՝ գլյուկոզի քանակական որոշումը հաճախորդի արյան մեջ: Ժամանակի ընթացքում մշակվել են այնպիսի ախտորոշիչ տեսթ-շերտեր և արտացոլող ֆոտոմետրեր, որոնք ապահովեցին անալիզի բավականին բարձր ճշգրտությունը: Ներկա դրությամբ ամբողջ աշխարհում լայն կիրառություն ստացել *One Touch* գլյուկոմետրերը և *Life Scan*-ի (ԱՄՆ) կողմից արտադրվող տեսթ-շերտերը, որոնք իրենց մեջ բավականին հաջող զուգակցում են քանակական ֆերմենտատիվ մեթոդի անալիտիկ ճշգրտությունը և «չոր քիմիայի» արագությունը և պարզությունը:

One Touch գլյուկոմետրերը նախատեսված են ամբողջական արյան մեջ գլյուկոզի մակարդակի արագ և ստույգ որոշման համար: *One Touch*-ի համար նախատեսված տեսթ-շերտերը պարունակում են բոլոր անհրաժեշտ քիմիական բաղադրամասերը երկփուլային գլյուկոօքսիդազապերօքսիդազային մեթոդի համար, ներառելով եզակի ծակոտկեն հիդրոֆիլ թաղանթի վրա կլանված գլյուկոզոօքսիդազա և պերօքսիդազա ֆերմենտները: Ռեակցիայի արդյունքում առաջանում է ներկված կոմպլեքս: Առաջացող գույնի ինտենսիվությունը գրանցվում է արտացոլող մինիֆոտոմետրով:



Նկար 3. Տեսթ-շերտի կառուցվածքը:

Թեսթ-շերտի թաղանթը հիշեցնում է միկրոսկոպիկ ծակոտկեններով սպունգ և իրականացնում է եռակի ֆունկցիա: Նա գործում է 1) որպես ռեզերվուար. հավաքում է արյան անհրաժեշտ քանակությունը; 2) որպես ֆիլտր. սահմանափակում է պինդ բջջային նյութը (էրիթրոցիտներ, լեյկոցիտներ և այլն); 3) որպես հարթ օպտիկական մակերես, որի վրա չափվում է արտացոլված լույսը: Վերջին ֆունկցիան մասնավորապես շատ կարևոր է սարքի աշխատանքի համար: Այն հնարավորություն է տալիս ընթերցելու շերտի ներքևի մասը այն դեպքում, երբ արյունը մնում է տեսթ-շերտի վերևի մասում:

Արյան կաթիլը տեսթ-շերտի մակերեսին հպվելով «ձգվում է», քանի որ թաղանթը օժտված է հիդրոֆիլ հատկությամբ:

One Touch սարքերի կազմի մեջ են մտնում երկու հատուկ լուսադիոդ: Զարգացած գույնի մշակումը տեսթ-շերտի վրա ընթանում է հետևյալ կերպ: Մինչ արյուն մտցնելը, երբ տեսթ-շերտը տեղադրում են սարքի մեջ, գրառվում է «0»: Տեսթ-շերտի վրա արյունը տեղադրելուց, արյան շիճուկը վայրկյանաբար սորբվում է թաղանթով, իսկ էրիթրոցիտները և պլազմայի ավելցուկը մնում են թաղանթի մակերեսի վրա: Արյան կաթիլը լրիվ ներծծվելուց հետո անմիջապես ներկվում է: Սարքը գրանցում է արտացոլված մեծության փոփոխությունը և ավտոմատորեն միացվում է վայրկյանացույցը: 45 վարկյան անց քիմիական ռեակցիան վերջանում է, իսկ լուսաարտացոլման արդյունքը մշակվում է: Ռեակցիայի հետևանքով ներկված նյութը կլանում է առաջին լուսադիոդով առաքած լույսը: Արյան ձևավոր տարրերը և ավելցուկ պլազման նույն ձևի կլանում են դիոդի կողմից արձակվող լույսը: Որպեսզի ճշգրտել ֆոնային արտացոլումը, երկրորդ ընթերցումը իրականացվում է երկրորդ լուսադիոդով ուրիշ երկարությամբ ալիքով: Առաջին և երկրորդ լուսադիոդների ազդանշանների տարբերությունը կրում է տեղեկատվություն քրոմոգենի կողմից լույսի կլանման մասին: Գլյուկոզի խտության գնահատման համար քրոմոգենից ստացած ազդանշանը համեմատվում է հատուկ ստուգաճշտի հետ:

One Touch բոլոր սարքերը ստուգաճշտված են ռեֆերենտային մեթոդի օգնությամբ, ինչը իրականացնում են գլյուկոզի լաբորատոր անալիզատորների վրա: Այդ գործընթացի միջոցով ստանում են հաստատուն տատանողական կոր:

Եզրափակելով, անհրաժեշտ է նաև հիշեցնել գլյուկոօքսիդազապերօքսիդազային մեթոդի թերությունների մասին: Առաջացած ջրածնի պերօքսիդը և անիոն-ռադիկալ գերօքսիդը կարող են օքսիդացնել ոչ միայն քրոմոգենը, այլ նաև կենսաբանական հեղուկներում գտնվող ուրիշ նյութերը՝ ասկորբինաթթուն, միզաթթուն, բիլիռուբինը և այլն: Այդ դեպքում, համապատասխանաբար, քրոմոգենի օքսիդացմանը մասնակցող պերօքսիդի բաժինը իջնում է, ինչը իր հերթին բերում է գլյուկոզի քանակության արդյունքների նվազեցում:

<u>Հեքսոկինազային մեթոդը:</u> Այս մեթոդը յուրահատուկ է, քանի որ արյան շիճուկի այլ բաղադրամասերի հետ ռեակցիա չեն տալիս: Հեքսոկինազային մեթոդը համարվում է առանձնահատուկ մեթոդ գլյուկոզի որոշման համար: Որպես օրենք, այն գծային է մինչև 50 մմոլ/լ, ինչը թույլ է տալիս այն երաշխավորել կլինիկաների էնդոկրինոլոգիական բաժինների համար:

Հեքսոկինազային մեթոդի հիմքում ընկած են երկու տարբեր հետևողական ռեակցիաներ՝

Գլյուկոզա + ԱԵՖ -$\xrightarrow{\text{հեքսոկինազա}}$> Գլյուկոզո-6-ֆոսֆատ + ԱԿՖ

Գլյուկոզո-6-ֆոսֆատ +ՆԱԴՖ$^+$ - $\xrightarrow{\text{6-Ⓟ գլյուկոդեհիդրոգենազա}}$>6-ֆոսֆոգլյուկոնաթթու +ՆԱԴՖՀ$_2$

Գրանցումը իրականացնում են 340 նմ ալիքի երկարությամբ՝ ըստ ՆԱԴՖ-ի լուսակլանման:

Biosen տիպի գլյուկոզայի անալիզատորները պահանջում են օպերատորից նվազագույն ջանք, քանի որ նրանք լրիվությամբ ավտոմատացված են և բավականին արդյունավետ (արագությունը 50-ից մինչև 200 փորձանմուշ/ժամ):

Մեր աշխատանքի նպատակն էր ներկայացնել գլյուկոզի ժամանակակից արագ և ճշգրիտ որոշման մեթոդները, քանի որ ամենա հուզող խնդիրներից մեկն է դարի հիվանդության՝ շաքարախտի բացահայտման համար:

Գրականություն

1. Պոպով Ա.Ռ., Կովինդիկով Ա.Մ., Սենիկ Ս.Յա. Բիոքիմիայի հիմունքներ և զոոտեխնիկական անալիզ, Երևան, 1977, 378 էջ:
2. Քամալյան Ռ.Գ. Կլինիկական կենսաքիմիայի հիմունքներ, Երևան, 2008:
3. Досон Д., Эллиот Д., Эллиот У. Справочник биохимика, Москва, 1991, 544 с.
4. Ронин В.С., Старобинец Г.М., Утевский Н.Л. Руководство к практическим занятиям по методике клинических исследований, 1968, 255 с.
5. Справочник фельдшера. Под ред. проф. Михайлова А.А., Москва, Медицина, 1990, 490 с.
6. Ткачук В.А. Клиническая биохимия, Москва, 2004, 515 с.
7. Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Мясоедов В.В., Завгородный И.В. Клиническая биохимия, Москва, 2002, 502 с.

Резюме

Определение концентрации глюкозы в крови – одно из наиболее часто выполняемых биохимических исследований в КДЛ. На сегодняшний день наибольшее распространение получили методы, основанные на использовании фермента – глюкозооксидазы. В основе использования глюкометров предназначена для быстрого и точного измерения уровня глюкозы в цельной крови, лежит именно этот принцип. Они обладают широким диапазоном измерений. Их можно использовать для диагностики неотложных состояний при диабете, в том числе бригадами “Скорой помощи”, поскольку эти приборы не только надежны, но и очень быстро выдают результаты анализов.