**Наименование СОПа**

Общий анализ ликвора.

1. **Цель (назаначение СОПа)**

Обеспечение качества проведения общего анализа ликвора.

1. **Персонал**

2.1 .К работе допускаются сотрудники, допущенные к работе в соответствии с установленным законодательством.

2.1.1 Исполнители: Врач КЛД, врач-лаборант, биолог.

2.1.2. Ответственный: Врач КЛД, врач-лаборант, биолог.

**2.2 Требования к персоналу**:

2.2.1. Принимая во внимание потенциальную опасность образцов биологического материла, персонал должен быть информирован и обучен правилам приема образцов, а также располагать всеми средствами защиты.

Принятие мер безопасности медицинских работников, выполнение требований противоэпидемического режима позволяет снизить эпидемиологический риск возникновения контактных инфекций при выполнении таких манипуляции, как прием венозной крови, а также при сборе других видов биологического материла.

2.2.2.При сборе биоматериала персонал должен быть одет в специальную защитную одежду:

1.халат (брюки и куртка или комбинезон). Халат нужно менять по мере загрязнения, но не реже двух раз в неделю. В случае загрязнения спецодежды биологическим материалом предусмотрена ее немедленная смена.

2. шапочку (косынка); ГОСТ 124132-83

3. перчатки. Перчатки должны быть одноразовыми, меняться после каждого пациента и использоваться на всех этапах взятия и сбора биологического материала. Из-за возможности загрязнения рук перчатки, снятые единожды, повторно не используются. Допускается многократное использование перчаток. Но после каждого пациента необходимо их обеззараживание – двукратная обработка салфетками, пропитанными антисептиками.

4. защитные очки, щитки;

5. одноразовая маска (при неблагополучной эпидемиологической обстановке, воздушно-капельной инфекции у персонала).

1. **Требования к помещениям и микроклимату.**

Весь биологический материал из отделений больницы, приемного покоя и реанимационных отделений в экспресс-лабораторию №6604. Требования к помещению:

3.1 Помещение должно быть чистым и непыльным.

3.2 Пол помещения (допустимый градиент: менее 1/200) должен быть рассчитан на нагрузку 485 кг, и не вибрировать.

3.3 В помещении должна быть хорошая вентиляция, уровень естественного и искусственного освещения должен соответствовать санитарным нормам и правилам

3.4 Рабочий температурный режим: от 18 до 32ºС. Изменение температуры в процессе работы не должно превышать 2 ºС. Для поддержания рабочей температуры нужно использовать воздушный кондиционер. Тепло, производимое анализатором в процессе работы, составляет приблизительно 8820 кДж/час.

3.5. Относительная влажность воздуха должна составлять от 40 до 80%.

1. **Требования к оборудованию.**

Диспетчерская оснащена:

1. Центрифуга лабораторная медицинская опн-3 -1 шт.
2. Облучатель-рециркулятор бактерицидный **Дезар**-3
3. Контейнеры для дезинфекции с маркировкой.
4. Контейнеры для дезинфекции с маркировкой .
5. Емкость с маркировкой «для отходов класса «А».
6. Емкость с маркировкой «для отходов класса «Б».
7. Лабораторный стол-1 шт.

Забор ликвора осуществляется в чистую сухую стеклянную пробирку.

**Требования к оборудованию (основное, вспомогательное).**

4.1 Биохимический анализатор AU 400.

4.2 Биохимический анализатор AU 680.

4.3 Фотометр колориметрический КФК-2.

4.4 Камера Фукс-Розенталя.

4.5 Микроскоп.

4.6 Центрифуга лабораторная медицинская опн-3.

4.7 Дозаторы пипеточные 1-канальные переменного объема (20-200 мкл, 10-1000 мкл, 1000-5000 мкл).

4.8 Холодильник с температурой холодильной камеры от +2С до 8С.

4.9 Термометр для контроля температуры в холодильнике с диапазоном температур -30С до +30С

4.10 Персональный компьютер.

4.11 Лазерный принтер.

4.12 Программа ЛИС,МИС.

4.13 Штативы для пробирок лабораторные.

4.14 Контейнеры для дезинфекции с маркировкой.

4.15 Контейнеры для дезинфекции с маркировкой.

4.16 Емкость с маркировкой «для отходов класса «А».

4.17 Емкость с маркировкой «для отходов класса «Б».

4.18 Лабораторный стол.

4.19 Стул с гигиеническим покрытием.

4.20 Полотенца бумажные, однослойные или другие разрешенные к применению в медицинской практике.

4.21 Держатель для одноразовых полотенец.

4.2Облучатель-рециркулятор бактерицидный Дезар-3 настенный, закрытого типа (рециркулятор) предназначен для непрерывного обеззараживания воздуха закрытых помещений в присутствии и отсутствии людей.

Биохимические анализаторы серии AU (400, 680) предназначены для проведения автоматизированного анализа в сыворотке, плазме, СМЖ, моче и других биологических жидкостях. Анализаторы проводят измерения аналитов в пробах человека и автоматически рассчитывают результат.

Для обеспечения гарантированной и точной работы анализатора перед его установкой следует обеспечить следующие рабочие условия:

1.Анализатор должен располагаться внутри помещения и на высоте не более 2000 м над уровнем моря.

2. На анализатор не должен падать прямой солнечный свет.

3. Рабочий температурный режим: от 18 до 32ºС. Изменение температуры в процессе работы не должно превышать 2 ºС. Для поддержания рабочей температуры нужно использовать воздушный кондиционер. Тепло, производимое анализатором в процессе работы, составляет приблизительно 8820 кДж/час.

1. **Диагностическое значение.**

Исследование белка в ЦСЖ имеет важное диагностическое значение при заболеваниях центральной нервной системы и мозговых оболочек, таких как энцефалиты (воспаление головного мозга), менингиты (воспаление твердой мозговой оболочки), арахноидиты (воспаление паутинной оболочки), сифилис мозга, нарушения мозгового кровообращения, опухоли, травмы.

Нормальная СМЖ бесцветна и прозрачна (как дистиллированная вода, по сравнению с которой и описывают обычно физические свойства ликвора).

Сероватый или серо-зеленый цвет ликвора обычно обусловлен примесью микробов и лейкоцитов. Красный цвет СМЖ различной интенсивности (эритрохромия) обусловлен примесью эритроцитов, встречающихся при свежих кровоизлияниях или травме мозга. Визуально пристутствие эритроцитов обнаруживается при их содержании более 500-600 в мкл.

При патологических процессах жидкость может быть ксантохромной – окрашенной в желтый или желто-коричневый цвет продуктами распада гемоглобина. Необходимо помнить и о ложной ксантохромии – окраске ликвора, вызванной лекарственными препаратами. Реже мы встречаем зеленоватый цвет СМЖ (гнойный менингит, абсцесс мозга). В литературе описан и корчневый цвет ликвора – при прорыве кисты краниофарингиомы в ликворные пути.

Мутность ликвора может быть обусловлена примесью клеток крови или микроорганизмов. В последнем случае мутность можно удалить центрифугированием. При содержании в СМЖ повышенного количества грубодисперсных белков она становится опалесцирующей.

**Белок в ликворе**

Более 80% белка СМЖ поступает из плазмы путем ультрафильтрации. **Содержание белка в норме в различных порциях: в вентрикулярном – 0.05-0.15 г/л, цистернальном 0.15-0.25 г/л, люмбальном 0.15-0.35 г/л.** Для определения концентрации белка в ликворе может использоваться любой из унифицированных методов (с сульфосалициловой кислотой и сульфатом аммония, и другие). Повышенное содержание белка в ликворе (гиперпротеинархия) может быть обусловлено различными патогенетическими факторами.

Исследование белка в ЦСЖ имеет важное диагностическое значение при заболеваниях центральной нервной системы и мозговых оболочек, таких как энцефалиты (воспаление головного мозга), менингиты (воспаление твердой мозговой оболочки), арахноидиты (воспаление паутинной оболочки), сифилис мозга, нарушения мозгового кровообращения, опухоли, травмы.

Гипопротеинархия - снижение уровня белка в люмбальном ликворе, ниже 0,22 г/л рассматривается как гидроцефильный ликвор.

Гиперпротеинархия - увеличение уровня белка в ликворе, служит показателем патологического процесса. Повышение белка в спинномозговой жидкости при разных патологических процессах (воспаление, травма, опухоль) зависят от нарушения гемодинамики в сосудах мозга, приводящей к

увеличению проницаемости их стенок и поступлению белковых молекул плазмы крови в ликвор. Поступление крови в ликворные пространства при разрыве сосудов мозга или продуктов распада опухоли мозга усугубляют степень протеинархии. Увеличение белка в ликворе может быть при туберкулезном, гнойном, серозном менингитах, после операций на мозге, полиемиелите, нефрите с уремией, сифилитическом параличе. При остром воспалении повышаются α- глобулины, при хронических - β- и γ- глобулины.

### Глюкоза в ликворе

**Глюкоза содержится в нормальном ликворе в концентрации 2.00-4.18 ммоль/л.** Эта величина подвержена значительным колебаниям даже у здорового человека в зависимости от пищевого режима, физической нагрузки, других факторов. Для корректной оценки уровня глюкозы в ликворе рекомендуется одновременно определять ее уровень и в крови, где в норме он в 2 раза выше. Повышенное содержание уровня глюкозы в крови (гипергликоархия) встречается при сахарном диабете, остром энцефалите, ишемических нарушениях кровообращения и других заболеваниях. Гипогликоархия отмечается при менингитах различной этиологии или асептическом воспалении, опухолевом поражении мозга и оболочек, реже – при герпетической инфекции, субарахноидальном кровоизлиянии.

### Хлориды в ликворе

**Хлориды - содержание в нормальном ликворе - 118-132 ммоль/л.** Увеличение концентрации в СМЖ наблюдается при нарушении их выведения из организма (заболевания почек, сердца), при дегенеративных заболеваниях и опухолях ЦНС. Снижение содержания хлоридов отмечается при энцефалитах и менингитах.

**Цитоз**

Увеличение содержания клеток в СМЖ (плеоцитоз) появляется чаще при воспалительных заболеваниях, в меньшей степени – при раздражении мозговых оболочек. Наиболее выраженный плеоцитоз отмечается при бактериальной инфекции, грибковых поражениях мозга и туберкулезном менингите. При эпилепсии, арахноидите, гидроцефалии, дистрофических процессах и некоторых других заболеваниях ЦНС цитоз остается нормальным.

Нейтрофильный лейкоцитоз чаще сопровождает острую инфекцию (локальные и диффузные менингиты). Эозинофилия СМЖ наблюдается достаточно редко – при эхинококкозе мозга, эозинофильном менингите. Эозинофилия ликвора не коррелирует как правило с числом эозинофилов в крови. Лимфоцитарный плеоцитоз ликворе встречается при вирусных менингитах, рассеянном склерозе, в хронической фазе туберкулезного менингита, после операций на оболочках мозга. При патологических процессах со стороны ЦНС отмечается полиморфизм лимфоцитов, среди которых встречаются активированные. Для них характерно наличие обильной бледноватой цитоплазмы с единичными азурофильными гранулами, некоторые клетки имеют отшнуровку или фрагментацию цитоплазмы (клазматоз). Плазматические клетки появляются в цитограмме при вирусном или бактериальном менингите, вялотекущих воспалительных процессах, в период выздоровления при нейросифилисе. Моноциты, подвергающиеся в ликворе дегенерации быстрее лимфоцитов, наблюдаются при рассеянном склерозе, прогрессирующем панэнцефалите, хронических вялотекущих воспалительных процессах. Макрофаги – “санитары” ликвора, появляются при кровоизлияниях, инфекциях, травматических и ишемических некроза

Иногда в СМЖ обнаруживаются атипичные клетки – элементы, которые по своим морфологическим особенностям не могут быть причислены к определенным клеточным формам. Атипичные клетки встречаются при хронических воспалительных процессах (туберкулезный менингит, рассеянный склероз и др), и часто они являются клетками опухолей. Вероятность находок опухолевых клеток в ликворе при опухолях головного мозга невелика (не более 1.5%). Обнаружение бластных клеток в СМЖ при гемобластозе позволяет говорить о нейролейкозе.

При анализе состава ликвора важно оценивать соотношение белка и клеточных элементов (диссоциацию). При клеточно-белковой диссоциации отмечается выраженный плеоцитоз при нормальном или незначительно увеличенном содержании белка. Это характерно для менингитов. Белковоклеточная диссоциация характеризуется гиперпротеинархией при нормальном цитозе. Данное состояние характерно для застойных процессов в ликворных путях (опухоль, арахноидит и др.).

1. **Расходные материалы.**

* пробирки (15-100 мм);
* штатив для пробирок;
* стакан химический (200 мл);
* наконечники для дозаторов;
* покровные стекла;

1. **Требования к исследуемому материалу.**

После доставки образца ликвора в лабораторию сотрудник лаборатории, принимающий материал, должен проверить правильность оформления направления на анализ, маркировку посуды (код или фамилия больного и другие данные должны быть идентичны данным, указанным в бланке-направлении) и зарегистрировать поступивший материал. Образец не должен содержать примесей и чужеродных материалов.

В направлении на исследование должна быть включена следующая информация: фамилия, имя, отчество пациента, возраст и дата рождения, пол, отделение медицинского учреждения, номер медицинской карты, идентификационный номер (штрих-код), дата и время сбора образца ликвора.

Пробоподготовка включает в себя перед микроскопическим исследованием – тщательное перемешивание, но не взбалтывание. К счету клеточных элементов желательно приступать возможно скорее после взятия жидкости, так как клетки вне организма иногда быстро разрушаются.

Для физико-химических исследований ликвор необходимо центрифугировать на 1000 об/мин в течение 10 минут.

1. **Процедура выполнения исследования.**

Метод качественного определения глобулиновых фракций белка в ликворе по реакции Нонне-Апельта - концентрация белка в ликворе пропорционально помутнению, появляющемуся при его коагуляции сернокислым аммонием.

Состав реагентов: насыщенный раствор сернокислого аммония.

Ход проведения исследования:

*Приготовление рабочего реагента:*

|  |
| --- |
| Для приготовления насыщенного раствора сернокислого аммония содержимое банки с сернокислым аммонием высыпать в химический стакан и прилить 60 мл горячей дистиллированной воды. Раствор взболтать, довести до кипения и полного растворения сернокислого аммония. Оставить стоять при комнатной температуре несколько дней. Готовый реактив должен иметь рН 7,0-7,1. Если реакция кислая, его следует подщелочить крепким раствором аммиака, осторожно добавляя его по каплям. |
|  |

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА:

В химическую пробирку пипеткой внести 0,5 мл реактива и 0,5 мл ликвора наслоением. Кольцо определяют через 2 минуты, затем жидкость встряхивают и отмечают интенсивность помутнения. Реакцию выражают плюсами.

1. Едва уловимая муть (+).

2. Более заметная муть (++).

3. Интенсивная муть (+++).

4. Отрицательная.

Количественное определение белка в ликворе.

Состав реагентов:

1. 60 г/л раствор сульфосалициловой кислоты.
2. 140 г/л раствор безводного сернокислого натрия.
3. Рабочий раствор для белка – 1 и 2 в равных количествах.
4. 9 г/л NaCl.

*Ход проведения исследования:*

В пробирку внести 5 мл рабочего раствора для белка (2,5 мл сернокислого натрия + 2,5 мл сульфосалициловой кислоты) и 0,5 мл ликвора. Перемешать и инкубировать 10 минут при комнатной температуре. После инкубации провести измерение на колориметре фотоэлектрическом концентрационном КФК 2МП в кювете 10 мл, светофильтр 440 нм. Для контроля использовать раствор натрия хлорида. Расчет концентрации проводится по калибровочному графику.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,06 | 0,07 | 0,08 | 0,09 |
| 0,00 | 0 | 0,03 | 0,06 | 0,09 | 0,12 | 0,15 | 0,18 | 0,21 | 0,24 | 0,27 |
| 0,1 | 0,29 | 0,30 | 0,31 | 0,33 | 0,38 | 0,4 | 0,43 | 0,46 | 0,48 | 0,53 |
| 0,2 | 0,54 | 0,56 | 0,59 | 0,61 | 0,64 | 0,67 | 0,7 | 0,73 | 0,76 | 0,79 |
| 0,3 | 0,81 | 0,83 | 0,85 | 0,88 | 0,91 | 0,94 | 0,96 | 0,99 | 1,01 |  |

Норма – 0,33 г/л.

Микроскопическое исследование: реактив Самсона предотвращает цитолиз клеток в смесителе в течение нескольких часов. Уксусная кислота, которая содержится в реактиве, растворяет эритроциты, фуксин окрашивает ядра клеток в интенсивный красный цвет, что облегчает счет клеток и их дифференцирование.

Пробирку с ликвором осторожно катают между ладонями (около 2 минут) для равномерного смешения ликвора без образования пена. Затем в пробирку вносят 20 мкл краски (Реактив Самсона) и 200 мкл ликвора, осторожно перемешивают, инкубируют 30 минут. Автоматическим дозатором или пастеровской пипеткой заполнить камеру Фукс-Розенталя. Так как в норме клеточных элементов мало, сосчитывают их на всей площади сетки камеры или 2-3 камер. Чтобы вычислить число клеток в 1 мкл, полученное количество делим на 3.

Норма – до 5 клеток в 1 мкл.

Количественное определение глюкозы и хлора на анализаторах Beckman Coulter серии AU.

Перед исследованием ликвор необходимо центрифугировать на 1000 об/мин в течение 10 минут. После центрифугирования в кювету вносим 400-500 мкл ликвора. Поместить в указанную анализатором позицию красного штатива. Поместить штатив в транспортер. Заказать нужное назначение из меню:

1. User.
2. Normal.
3. В окне S.NO указываем E.
4. Start Entry.
5. Выбрать методики: Glu и Cl.
6. Entry.
7. Exit.
8. Старт через зеленую (большую) кнопку на мониторе компьютера.

Чтобы посмотреть результаты:

1. Нажать на кнопку с изображением анализатора.
2. Data Display.
3. Чтобы посмотреть полученные результаты Measured Data.
4. Close, Exit.
5. **Постаналитический этап.**

Полученные результаты ввести вручную в систему QMS, авторизовать и распечатать.