**1 день( 26.03.20)**

**Инструктаж по технике безопасности**

1. Работать в лаборатории необходимо в халате, колпаке, перчатках, сменной обуви.

2. Каждый должен работать на закрепленном за ним рабочем месте. Переход на другое место без разрешения не допускается.

3. Рабочее место следует поддерживать в чистоте, не загромождать его посудой и побочными вещами.

4. Студентам запрещается работать в лаборатории без присутствия преподавателя или лаборанта, а также в неустановленное время.

5. До выполнения каждой лабораторной работы можно приступить только после получения инструктажа по технике безопасности и разрешения.

6. Приступая к работе, необходимо: прочитать методику работы, правила ее безопасного выполнения; проверить соответствие взятых веществ тем веществам, которые указаны в методике работы.

7. Опыт необходимо проводить в точном соответствии с его описанием в методических указаниях, особенно придерживаться очередности добавления реактивов.

9. Пролитые на пол и стол химические вещества обезвреживают и убирают под руководством лаборанта (преподавателя) в соответствии с правилами.

11. По окончании работы следует привести в порядок свое рабочее место: протереть поверхность рабочего лабораторного стола, закрыть водопроводные краны, выключить электрические приборы.

При порезе или проколе инструментом, контактирующим с биологическими жидкостями:

-вымыть руки, не снимая перчаток, проточной водой с мылом, обработать антисептиком, снять перчатки рабочей поверхностью вовнутрь.

-если кровь идет – не останавливать.

-если крови нет, то выдавить несколько капель крови, вымыть руки с мылом под теплой проточной водой, обработать руки 70% спиртом, смазать ранку 5% спиртовым раствором йода.

-при наличии на руках микротравм, царапин, ссадин заклеить поврежденные места лейкопластырем.

При попадании биологических жидкостей:

На перчатки – перчатки обработать салфеткой, смоченной в дез. растворе, вымыть руки в перчатках под проточной водой с мылом, снять перчатки рабочей стороной вовнутрь, погрузить перчатки в емкость для дезинфекции, руки вымыть с мылом под проточной водой и обработать кожным антисептиком.

На спецодежду – снять рабочую одежду и погрузить в дезраствор.

На незащищенную кожу – обработать кожу 70% спиртом, вымыть кожу дважды с мылом под теплой проточной водой, повторно обработать 70% спиртом.

В глаза – сразу же промыть водой или 20-30% раствором альбуцида

В нос – обработать 20-30% раствором альбуцида

В рот – прополоскать 70% этиловым спиртом или 0,05% раствором марганцовокислого калия или 1% водным раствором борной кислоты. Слизистые оболочки носа, губ, конъюнктивы обрабатывают также раствором марганцево-кислого калия.

На каждом рабочем месте должны быть сформированы и укомплектованы аптечки оказания первой помощи в вышеуказанных случаях, кроме необходимых антисептиков укомплектовать аптечки лейкопластырем, напальчниками и пипеткой.

О каждом случае повреждения, связанного с возможным загрязнением кровью или другими биологическими жидкостями при выполнении своих обязанностей, ставить в известность зав. отделением и старшую медсестру отделения (в ночное время – дежурного врача) и регистрировать в журнале регистрации несчастных случаев, хранящихся на рабочих местах.

В случае оказания медицинской помощи, персонал, получивший травму кожи или загрязнения слизистых оболочек биоматериалом пациента, расценивается как «медицинский контакт». Если пациент известен, его при возможности необходимо обследовать на ВИЧ, вирусные гепатиты В и С.

Подпись общего руководителя\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Подпись студента\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Нормативные документы, регламентирующие диагностические лаборатории:

1. Приказ № 408 МЗ СССР от 12.07.89 «О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами»
2. Приказ № 170 МЗ РФ от 15.08.94 «О мерах по совершенствованию профилактики и лечения ВИЧ инфекции в РФ»
3. Инструкция по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в КДЛ ЛПУ
4. ГОСТ 42-21-2-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения».Структура КДЛ:

Клинико-диагностические лаборатории подразделяются на две большие группы:

1. лаборатории общего типа;
2. специализированные лаборатории.

Структура лабораторной службы в основном соответствует потребностям учреждений здравоохранения в лабораторной диагностике, обеспечивая повседневные запросы лечащих врачей в наиболее распространенных исследованиях (КДЛ общего типа), экстренном их выполнении (экспресс-лаборатории), а также серийное производство наиболее сложных исследований. Этим занимаются специализированные лаборатории (гематологические, цитологические, биохимические, иммунологические).

**2 день( 27.03.20)- Определение гемоглобина**

**Методы определения:**

1. Гемиглобинцианидный
2. Гемихромный
3. Сали( не унифицированный)
4. С помощью автоматических анализаторов

Гемиглобинцианидный метод:

Принцип. Гемоглобин при взаимодействии с железосинеродистым калием (красная кровяная соль) окисляется в метгемоглобин (гемиглобин) образующий с ацетонциангидрином гемиглобинцианид, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию гемоглобина.

Реактивы:

1. Трансформирующий раствор
2. Калибровочный раствор гемиглобинцианида.

Ход определения:

Опытная проба:

1) В пробирку налить 5,0 мл трансформирующего раствора.

2) Прилить 0,02 мл крови капилляром Сали (разведение в 251 раз).

3) Хорошо перемешать, оставить стоять при комнатной температуре 20 минут.

4) После чего измерить на фотоэлектроколориметре при длине волны 500 – 560 нм (зеленый светофильтр) в кювете 10 мм. Или МИНИГЕМе-540.

Холостая проба – трансформирующий раствор.

5) Расчет содержания гемоглобина производят по калибровочному графику

Гемихромный метод:

Принцип: гемоглобин крови под действием поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия переходит в низкоспиновую окисленную форму- гемихром, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации гемоглобина в крови и измеряется фотометрически при длине волны 500-560 нмю

Ход определения:

1) В пробирку налить 5,0 мл трансформирующего раствора.

2) Прилить 0,02 мл крови капилляром Сали (разведение в 251 раз).

3) Хорошо перемешать, оставить стоять при комнатной температуре 20 минут.

4) После чего измерить на фотоэлектроколориметре при длине волны 500 – 560 нм (зеленый светофильтр) в кювете 10 мм.

5) Концентрацию гемоглобина рассчитать по формуле.

Преимущества:

1. позволяет получить результат в день сдачи исследования;
2. методика гемихромного метода не использует токсические реактивы, которые могут навредить здоровью;
3. простота метода, использование дешевых реактивов, которые экономят деньги клинического учреждения; точность полученных показателей,
4. необходимость использования малого количества крови для анализа
5. использование незначительного количества реактивов

Недостатки:

1. ошибки на этапе сдачи крови;
2. неправильного приготовления реактива, дозирование;
3. в методике гемиглобинцианидного метода используется токсичный реактив- цианид.

Метод Сали- Устаревший, не точный, не унифицированный

Принцип: гемоглобин под влиянием соляной кислоты, превращается в солянокислый гематин бурого цвета, интенсивность окраски которого сравнивают со стандартом.

Недостатки:

1. Время. На изучение крови 1 пациента затрачивается не менее 20 минут. При этом использование автоматизированных систем позволяет получить результат за несколько секунд.
2. Субъективность. Хроматическая методика Сали тесно связана с индивидуальным восприятием цвета. Соответственно, результаты могут различаться даже у 1 лаборанта в зависимости от внешних факторов.
3. Точность. Стандартная погрешность метода — 3 г/л. При использовании старых образцов контрольных пробирок, высоком содержании билирубина в крови и при плохом освещении результат определения уровня гемоглобина может отличаться еще больше, вплоть до 30% от реальных показателей.

**День 3(28.03.20)- Методический день**

**День 4(30.03.20)- Определение СОЭ**

Принцип: смесь крови с цитратом при стоянии разделяется на 2 слоя: нижний-эритроциты и верхний- плазма.

Ход определения:

1. Капилляр Панченкова промывают цитратом натрия
2. Набирают в пробирку цитрат до метки 75(25 делений)
3. Набирают кровь в капилляр до метки «О»
4. Выдувают кровь в пробирку и перемешивают с цитратом
5. Набирают капилляр Панченкова и устанавливают в штатив Панченкова

Преимущества:

1. Определение скорости оседание эритроцитов производится незамедлительно.
2. Метод Панченкова является самой быстрой и нетребовательной процедурой по определению СОЭ.

Недостатки:

1. Из-за ручных манипуляций результаты можно назвать субъективными.
2. Отсутствие автоматизированного метода определения СОЭ.

Метод Вестергрена:

1. венозная кровь берется в вакуумные пробирки с К-ЭДТА (капиллярная кровь берется в пробирки с К-ЭДТА);

2. пробу венозной (капиллярной) крови смешать с 5% раствором натрия цитрата в соотношении 4:1;

3. произвести забор крови в капилляр Вестергрена;

4. через 1 ч измерить СОЭ по высоте столба прозрачной плазмы.

Метод Вестергрена в настоящее время полностью автоматизирован, что существенно повышает производительность КДЛ и качество результатов.

Преимущество измерения по Вестергрену — высокая чувствительность и точность по сравнению с другими способами.

Недостатки: пониженная степень точности при аномально высоких значениях показателя, если он выше 60 мм/час.

**День 5(31.03.20)- Определение количества лейкоцитов.**

1. В счетной камере Горяева
2. С помощью автоматических анализаторов

Принцип: Подсчет лейкоцитов под микроскопом в определенном объёме счетной камере при постоянном разведении крови после разрушения эритроцитов.

Ход определения:

1. Производим забор капиллярной крови
2. Вносим 0,02 мл крови в пробирку с 0,4 ил уксусной кислоты(3-5%)
3. Заполняем камеру Горяева и производим подсчет лейкоцитов в 100 больших неразграфленных квадратах.
4. Подсчитываем количество лейкоцитов по формуле.

Недостатки:

* Этот метод уступает точностью автоматическим методам

**День 6(1.04.20)- Определение количества эритроцитов**

1. В счетной камере Горяева
2. С помощью автоматических анализаторов

Принцип: Подсчет эритроцитов под микроскопом в определенном рбъеме камеры при постоянном разведении крови.

Ход определения:

1. Производим забор крови.
2. Вносим 0,02 мл крови в пробирку с 4мл физ. Раствора и перемешиваем
3. Заполняем камеру Горяева и производим подсчет эритроцитов в 5 больших квадратах по диагонали, разграфленных каждый на 16 малых.
4. Подсчитываем по формуле.

Недостатки:

• Этот метод уступает точностью автоматическим методам

**День 7(02.04.20)- Приготовление мазка крови.**

Мазок делается с помощью шлифованного стекла с идеально ровным краем, ширина которого должна быть на 2-3 см меньше, чем у предметного стекла. Делается не менее 2 мазков.

* После прокола пальца убираем первую каплю крови. К куполу следующей капли прикасаются предметным стеклом на расстоянии 1,5-3 см от края раны.
* Шлифованное стекло ставят под углом 45⁰ на 1-2 мм перед каплей и двигают его назад к капле так, чтобы вся кровь растеклась по краю шлифованного стекла.
* Быстрым движением делают мазок, пока не кончится вся капля крови.
* Высушивают мазок на воздухе.
* Маркируют мазок

Требования к мазку:

1. Равномерной толщины, полупрозрачный, желтоватого цвета.
2. Достаточной величины- занимать ½-3/4 длины предметного стекла, отступив от края на 1-1,5 см
3. Оканчивается метёлочкой

В правильно приготовленных мазках клетки располагаются в один слой. Готовые высушенные мазки крови фиксируют, а затем окрашивают. В неокрашенном виде мазки сохраняются при комнатной температуре и в течении 3 дней.

Окрашивание мазков крови

Перед окрашиванием мазки фиксируют. Фиксация предохраняет элементы крови от воздействия содержащейся в красках воды, под влиянием которой в нефиксированных мазках происходит разрушение эритроцитов и изменение морфологии лейкоцитов. Фиксация также вызывает коагуляцию белков и закрепляет мазок на стекле.

Для фиксации используют:

1. Метиленовый спирт ( фиксация 3-5 минут)
2. Раствор эозинметиленового синего по Май-Грюнвальду
3. Этилоый спирт(20-25 минут)
4. Смесь Никифорова (30 минут)

Окрашивание проводят одним из методов:

1. По Романовскому-Гимзе
2. По Нохту
3. По Паппенгейму

ОКРАСКА ПО РОМАНОВСКОМУ – ГИМЗЕ

Ход окраски:

* В специальную кювету для окрашивания наливают рабочий раствор

краски Романовского, приготовленный непосредственно перед

использованием в соответствии с установленным титром.

* В рабочий раствор красителя опускают штатив с сухими

фиксированными мазками.

* Красят мазки в соответствии с выбранной экспозицией.
* Промывают мазки проточной водой и высушивают на воздухе.

ОКРАСКА ПО НОХТУ

Ход окраски

* Окраску производят так же, как методом Романовского – в кюветах с

помощью свежеприготовленного рабочего раствора азур-эозина в течение 20-

45 минут.

* Пропорции красителей и время окраски устанавливаются опытным

путем для каждой партии красителя.

ОКРАСКА ПО ПАППЕНГЕЙМУ

Ход окраски.

* Мазки не нуждаются в предварительной фиксации, так как краска Май-Грюнвальда, приготовленная на метиловом спирте, одновременно и

фиксирует, и красит мазок.

* На нефиксированный мазок наносят 2 мл красителя-фиксатора Май-Грюнвальда на 3 минуты.
* Доливают столько же (2 мл) дистиллированной воды и выдерживают 1

минуту.

* Краску сливают, промывают мазки водопроводной водой.

мазки рабочим раствором азур-эозина по Нохту или разведенной

краской Романовского в течение 8-15 минут.

* Время окрашивания

устанавливают опытным путем для каждой новой партии красителя.

* Промывают мазки водой и высушивают на воздухе.

 Критериями правильности окраски при использовании любого метода

окрашивания является цвет клеток и их структур: эритроциты должны быть

светло-розового цвета, нейтрофильная зернистость – фиолетового,

эозинофильная зернистость – розово-оранжевого цвета.

Подсчет лейкоцитарной формулы

Подсчет лейкоцитарной формулы проводят при микроскопии

окрашенного мазка крови с иммерсионной системой (объектив 90х, окуляр

7х или 10х, конденсор поднят).

 Для регистрации клеток используют лабораторные счетчики СЛ-1

(счетчик лабораторный –1) или более современные его модификации.

 Подсчет лейкоцитов проводят в тонкой части мазка, где эритроциты

лежат одиночно, а не сложены в «монетные столбики». Считают все

встречающиеся целые, не разрушенные клетки, дифференцируя их по видам.

 Лейкоциты располагаются в мазке неравномерно: более крупные клетки

(моноциты, эозинофилы, нейтрофилы) встречаются чаще по краю мазка, а

более мелкие (лимфоциты) – в его середине, поэтому подсчет лейкоцитарной

формулы следует проводить как по краю, так и по середине мазка,

передвигая его по зигзагообразной линии – «линии меандра.

 Если количество лейкоцитов у обследуемого в пределах нормы и при

подсчете первых 100 лейкоцитов не обнаружено никаких отклонений ни в

составе лейкоцитарной формулы, ни в морфологии клеток, то

ограничиваются подсчетом 100 лейкоцитов. Если же были выявлены какиелибо отклонения от нормы (например, увеличение количества

палочкоядерных форм, эозинофилов или появление лейкоцитов, в норме в

периферической крови не обнаруживаемых), необходим подсчет 200

лейкоцитов. При лейкоцитозах всегда следует подсчитывать 200 лейкоцитов.

Для расчета лейкоцитарной формулы в этом случае полученные результаты

нужно разделить на 2.

**День 8(03.04.20)- Определение количества ретикулоцитов**

Принцип: Суправитальная (прижизненная) окраска красителями, выявляющими

зернисто-нитчатую субстанцию.

Окраска ретикулоцитов может проводиться как на предметном стекле, так

и в пробирке.

Окраска на стекле.

 Хорошо вымытые и обезжиренные стекла слегка подогревают над

спиртовкой. Стеклянной палочкой наносят 1 каплю одного из красителей,

делают мазок из краски шлифованным стеклом и высушивают его. В таком

виде мазки можно готовить впрок и хранить в закрытой посуде в темном

месте. На мазок краски наносят 1 каплю крови и готовят из нее тонкий

мазок. Тотчас же, не давая высохнуть крови, помещают мазок во влажную

камеру (чашку Петри с уложенной по бортикам фильтровальной бумагой)

на 3-4 минуты. Высушивают на воздухе и микроскопируют.

Окраска в пробирке.

Метод 1.

В пробирку помещают: 4 капли краски 1 + 1 каплю 1% оксалата калия;

вносят туда 2 капилляра Сали (0,04 мл) крови;

закрывают влажной ваткой, перемешивают и оставляют на 30 минут;

снова перемешивают и готовят тонкие мазки.

Метод 2.

В пробирку помещают 0,05 мл краски 3 и 0,2 мл крови;

смесь закрывают влажной ваткой, тщательно перемешивают и оставляют на

20-30 минут;

перемешивают и готовят тонкие мазки.

Метод 3.

В пробирку помещают 0,3-0,5 мл краски 2 и 5-6 капель крови капилляром

Панченкова;

закрывают пробирку резиновой пробкой, тщательно перемешивают и

оставляют на 1-1,5 часа;

перемешивают и готовят тонкие мазки.

Подсчет количества ретикулоцитов

 Окрашенный одним из описанных методом мазок микроскопируют с

иммерсионной системой: окуляр 7 Х, объектив 90 Х, конденсор поднят.

В мазках эритроциты окрашены в желтовато-зеленоватый цвет, зернистонитчатая субстанция – в синий цвет.

 Подсчитывают не менее 1000 эритроцитов, отмечая среди них количество эритроцитов, содержащих зернисто-нитчатую субстанцию.

Ретикулоциты как молодые эритроциты входят в счет 1000 эритроцитов.

 Для облегчения подсчета используют ограничитель поля зрения, готовя его таким образом, чтобы одновременно в поле зрения находилось около 50 эритроцитов. Затем просчитывают 20 таких полей зрения. Количество ретикулоцитов выражают на 1000 эритроцитов, в процентах или в промилле. 1 промилле (‰) = 1/1000.

**День 9(04.04.20)- Методический день**

**День 10(06.04.20)**

**УНИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМАТОКРИТА**

**С ПОМОЩЬЮ МИКРОЦЕНТРИФУГИ**

 Гематокрит отражает соотношение объема плазмы и форменных

элементов крови. За гематокритную величину принято считать объем

эритроцитов.

Принцип: Центрифугирование крови в присутствии антикоагулянтов в течение

определенного времени при постоянном числе оборотов центрифуги.

Специальное оборудование:

 микроцентрифуга для определения гематокрита в комплекте со

специальными капиллярами.

Ход определения.

* В предварительно обработанный антикоагулянтом и высушенный капилляр набирают кровь из пальца на 7/8 длины капилляра.
* Укупоривают капилляры с одного конца специальной пастой (или пластилином) и помещают их в ротор центрифуги так, чтобы укупоренные концы упирались в резиновую прокладку.
* Центрифугируют 5 минут при 8000 об/мин.
* По специальной шкале, приложенной к центрифуге, определяют гематокритную величину.

 Гематокрит также можно определить методами:

* Унифицированным микрометодом в модификации Й. Тодорова, при котором ход анализа аналогичен описанному выше, но вместо специальной центрифуги и капилляров используются капилляры Панченкова, обрезанные с верхнего конца до длины 10см, и подходящая центрифуга.
* С помощью гематологических автоматов.

Нормальные величины

* мужчины - 40-48%;
* женщины – 36-42%.

Определение длительности кровотечения по Дуке

Принцип: Определяется длительность кровотечения из капилляров после прокола кожи скарификатором.

Ход работы.

* Глубина прокола должна быть не менее 3мм – только при этом условии кровь из ранки выделяется самопроизвольно, без нажима.
* Сразу после прокола включают секундомер.
* Первую каплю крови не удаляют ватой, как обычно, а прикасаются к ней фильтровальной бумагой, которая впитывает кровь. Далее снимают фильтровальной бумагой выступающие капли крови через каждые 30 секунд. Постепенно капли крови становятся все меньше.
* Когда следы крови перестанут оставаться, секундомер выключают.

Длительность кровотечения по Дуке составляет 2-4 минуты.

Недостатки метода:

1. При недостаточно глубоком проколе результаты искажаются.
2. При прикосновении фильтровальной бумаги к коже, кровь останавливается.

Определение время свёртывания крови:

Принцип: Определяется время образования сгустка крови в капилляре Панченкова.

Ход работы.

* Прокалывают кожу, удаляют первую каплю крови.
* Набирают самотеком кровь в чистый сухой капилляр Панченкова до метки «70-75» (25-30делений) без пузырьков воздуха.
* Включают секундомер.
* Наклоном капилляра перемещают кровь на середину трубки.
* Через каждые 30 секунд наклоняют капилляр поочередно вправо и влево под углом 45 градусов. При этом капилляр необходимо плотно держать в руке, чтобы сохранить более высокую и постоянную температуру свертывающейся крови.
* В начале исследования кровь свободно перемещается внутри капилляра, а затем ее движение замедляется и появляется «хвостик» из нитей фибрина – это говорит о начале свертывания крови.
* При полном свертывании кровь перестает двигаться.
* Моменты начала и конца свертывания крови засекают по секундомеру.

Нормальные величины. Начало свертывания – 30 секунд – 2 минуты; конец

свертывания – 3-5 минут.

**День 11(07.04.20)- Определение количества тромбоцитов.**

1. В мазке по Фонио
2. В камере Горяева
3. С помощью автоматического анализатора

УНИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД

ПОДСЧЕТА КОЛИЧЕСТВА ТРОМБОЦИТОВ В МАЗКАХ КРОВИ

ПО ФОНИО

Принцип: В окрашенных мазках крови подсчитывают количество тромбоцитов,

встречающихся при подсчете 1000 эритроцитов. Одновременно в счетной

камере Горяева определяют количество эритроцитов в 1л крови, а затем

делают пересчет количества тромбоцитов на 1л крови.

Ход работы:

* В капилляр Панченкова набирают один из реактивов до метки «75», выдувают в серологическую пробирку.
* Этим же капилляром берут кровь из пальца до метко «0» (К), выдувают ее в пробирку с реактивом, перемешивают.
* Готовят из смеси тонкие мазки, высушивают их, фиксируют и окрашивают по Романовскому в течение 2-3 часов, если использовался сульфат магния и в течение 30-40 минут, если использовали ЭДТА. Тромбоциты при этом окрашиваются в фиолетовый цвет.
* Одновременно берут кровь для подсчета количества эритроцитов.

Техника подсчета тромбоцитов

* Окрашенные мазки исследуют при условиях: окуляр 7Х или 10Х, объектив 90х, конденсор поднят.
* Подсчет количества тромбоцитов ведут в тонких местах препарата следующим образом: в каждом поле зрения считают число эритроцитов и тромбоцитов, передвигая мазок до тех пор, пока не будут посчитаны 1000 эритроцитов.

Для удобства счета и большей точности пользуются окуляром с

ограничителем поля зрения по Фонио. Для ограничения поля зрения в

окуляр вкладывают кружок из бумаги с небольшим отверстием по центру в

форме ромба. В ограниченном поле зрения должно быть видно около 50

эритроцитов. Сосчитав 1000 эритроцитов, суммируют количество встретившихся при этом тромбоцитов (всего примерно 20 полей зрения).

Преимущества метода:

1. при рассмотрении крови под микроскопом лаборант четко видит исследуемый материал, цвет, форму, число клеток;
2. при необходимости анализ можно проводить в любое время суток;
3. метод прост в использовании, что связано с простой формулой, но в то же время очень информативен.

К недостаткам относится относится врачебная ошибка. Медицинский персонал может допустить следующие ошибки:

1. плохое прокрашивание мазка (использование большого количества краски, применение просроченных реактивов, неправильное время для фиксации), которое приводит к отсутствию изображения под микроскопом; о
2. шибка лаборанта в подсчете клеток.

**День 12(08.04.20)**

**УНИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

**ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ**

Под резистентностью (стойкостью) клеток понимают их способность

противостоять разрушительным воздействиям: осмотическим, механическим,

тепловым, химическим и др.

Принцип: Осмотическая резистентность эритроцитов определяется по степени их

гемолиза в гипотонических растворах хлорида натрия.

Ход определения:

* В стерильную пробирку, содержащую 2 капли гепарина, вносят 1,5мл крови, хорошо перемешивают.
* В 14 центрифужных пробирках готовят ряд разведений из рабочего раствора хлорида натрия в соответствии с таблицей разведений. В каждую пробирку вносят по 1 капилляру Сали гепаринизированной крови.
* Перемешивают содержимое всех 14 пробирок, начиная с первой, и оставляют стоять 30 минут при комнатной температуре.
* Центрифугируют содержимое пробирок в течение 5 минут при 2000 об/мин.
* Колориметрируют надосадочные жидкости пробирок № 2-14 при условиях: светофильтр – зеленый (длина волны 500-560нм); кювета 10 мм; против холостой пробы.

 Холостая проба - надосадочная жидкость в пробирке, содержащей 1%

раствор NaCl (пробирка № 1).

**День 13(09.04.20)-Определение гематологических показателей на**

**гематологическом анализаторе**

Все многообразие гематологических приборов можно условно разделить на 3 класса.

1. Первый класс – полуавтоматические счетчики клеток крови, определяющие обычно от 4-х до 10 параметров (количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, концентрацию гемоглобина, гематокрит, расчетные эритроцитарные индексы). В анализаторах первого класса используется кондуктометрический метод,
2. Второй класс - автоматические анализаторы, проводящие анализ цельной крови и определяющие до 20 параметров. Они дополнительно определяют расчетные показатели тромбоцитов, строят гистограммы (графические изображения) распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему, а также проводят частичную дифференцировку лейкоцитов на гранулоциты, лимфоциты и «средние клетки», состоящие преимущественно из эозинофилов и базофилов.
3. Третий класс – высокотехнологичные гематологические анализаторы, позволяющие проводить развернутый анализ крови, включая полный подсчет лейкоцитарной формулы. В основе работы приборов этого класса лежит комбинация нескольких методов: кондуктометрического, лазерного, цитохимического и др

**День 14(10.04.20)- Определение групп крови**

Группа крови – это сочетание антигенов эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и белков плазмы, которое генетически предопределено и не меняется в течение жизни

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУПП КРОВИ СИСТЕМЫ АВ0 ПРИ ПОМОЩИ СТАНДАРТНЫХ ИЗОГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК ГРУППА КРОВИ

Принцип.: Выявляют агглютиногены эритроцитов с помощью реакции агглютинации со стандартными сыворотками, содержащими агглютинины. По наличию или отсутствию агглютиногенов в исследуемых эритроцитах судят о групповой принадлежности крови.

Реагенты:

1. Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки 0(I)αβ, А(II)β и В(III)α групп двух

разных серий каждой группы;

2. Стандартная изогемагглютинирующая сыворотка АВ(IV)0 группы;

3. Изотонический раствор хлорида натрия (0,9% NaCl – физиологический раствор).

Специальное оснащение:

- белая пластинка со смачиваемой поверхностью;

- глазные пипетки;

- химические стаканчики;

- стеклянная палочка;

- вата, спирт, скарификаторы.

Подготовительная работа:

 Определение групп крови должно производиться при хорошем освещении и при температуре 15-25ºС.

 Флаконы со стандартными сыворотками ставят в специальный штатив в следующем

порядке: слева – стандартные сыворотки 0(I)αβ группы (одна сзади другой), в середине

– стандартные сыворотки А(II)β группы и справа – стандартные сыворотки В(III)α

группы. Отдельно ставят стандартную сыворотку IV группы крови, употребляемую в качестве дополнительного контроля.

 В каждый флакон со стандартной сывороткой опускают сухую чистую глазную пипетку.

 Для промывания стеклянных палочек в химический стаканчик наливают воду.

 В стаканчик с физраствором опускают глазную пипетку.

Техника определения группы крови при помощи стандартных сывороток:

 На верхнем крае пластинки пишут фамилию и инициалы человека, у которого

определяют группу крови.

 Делят стеклографом пластинку на 6 частей: по 3 в 2 ряда.

 В левом столбце сверху подписывают анти-А+В (0αβ); в среднем столбце – анти-В (Аβ);

в правом столбце – анти-А (Вα).

 Под соответствующими обозначениями на пластинку с помощью глазной пипетки наносят по одной большой капле (0,1мл) изогемагглютинирующей сыворотки 1-3 групп двух разных серий – всего 6 капель. Каждую пипетку сразу же опускают в тот же флакон с сывороткой, из которого она была взята.

 Кровь для исследования берут из пальца. Помещают одну каплю крови в лунку предметного стекла или на нижнюю часть пластинки.

 Наносят чистой сухой стеклянной палочкой маленькие капли крови рядом с каждой каплей стандартной сыворотки. При этом капли крови должны быть примерно в 10 раз меньше капель сывороток.

 Перемешивают капли стандартных сывороток с находящимися рядом каплями крови стеклянной палочкой. После размешивания каждой капли стеклянную палочку промывают в стаканчике с водой и насухо вытирают ватой или фильтровальной бумагой.

 Замечают время.

 В течение 3 минут периодически покачивают пластинку.

 Через 3 минуты в те капли, где наступила агглютинация, добавляют по 1 капле

изотонического раствора NaCl и периодически покачивают пластинку еще в течение 2

минут.

 Через 5 минут после перемешивания капель оценивают результаты реакции.

Источники ошибок:

-Несоблюдение времени реакции. При учете результатов ранее 5 минут можно

пропустить позднюю агглютинацию. При учете результатов позднее 5 минут капли

начинают подсыхать и агрегация эритроцитов по периферии капель может быть

ошибочно принята за агглютинацию.

- Если пластинку не покачивать, то эритроциты на дне образуют скопления, симулирующие агглютинацию.

- Образование «монетных» столбиков из эритроцитов, которые можно принят за

агглютинаты. Прибавление физраствора разрушает их.

- Отсутствие дополнительного контроля для IV группы крови.

- Применение загрязненных или мокрых пипеток, палочек, пластин.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУПП КРОВИ СИСТЕМЫ АВ0

С ПОМОЩЬЮ ЦОЛИКЛОНов АНТИ-А и АНТИ-В

Принцип. Такой же, как при определении групп крови со стандартными сыворотками – то есть выявление агглютиногенов в исследуемых эритроцитах с помощью агглютининов, содержащихся в Цоликлонах анти-А и анти-В.

Реагенты:

1. Цоликлон анти-А (розового цвета);

2. Цоликлон анти-В (голубого цвета).

Специальное оснащение

такое же, как для определения групп крови со стандартными изогемагглютинирующими

сыворотками.

 Техника определения

 Определение групп крови должно производиться при хорошем освещении и при

температуре 15-25ºС.

 Определение может производиться в нативной крови с консервантом или в крови без

консерванта, в том числе взятой из пальца.

 Размечают пластинку на 2 части.

 Левую часть пластинки подписывают «анти – А», правую – «анти – В».

 Наносят по одной большой (0,1мл) капле Цоликлонов анти-А и анти-В под

соответствующими обозначениями.

 Наносят по одной маленькой капле крови (в 10 раз меньшей, чем капли реагентов) рядом

с каждой каплей Цоликлона.

 Перемешивают капли крови с реагентом стеклянной палочкой, промывая после

перемешивания палочку в воде и вытирая её насухо.

 Замечают время.

 Периодически покачивая пластинку, ждут 3 минуты. Агглютинация эритроцитов с

Цоликлонами обычно наступает в первые 3-6 секунд, но оценку результатов реакции

ведут через 3 минуты, чтобы не пропустить позднюю агглютинацию со слабыми

разновидностями антигена А или В.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУППЫ КРОВИ СИСТЕМЫ АВ0

ПЕРЕКРЕСТНЫМ МЕТОДОМ

Перекрестный метод используется для компетентного определения группы крови, которое проводится в подтверждающей лаборатории специалистом иммуногематологом.

Принцип. Одновременное определение агглютиногенов эритроцитов исследуемой крови с помощью стандартных сывороток и агглютининов исследуемой сыворотки с помощью

стандартных эритроцитов.

Реагенты:

1. Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки 0(I)αβ, А(II)β и В(III)α групп двух

разных серий каждой группы;

2. Стандартные эритроциты групп 0(I), А(II) и В(III).

3. Изотонический раствор хлорида натрия (0,9% NaCl – физиологический раствор).

Подготовительная работа

 Определение групп крови должно производиться при хорошем освещении и при температуре 15-25ºС.

 Флаконы со стандартными сыворотками ставят в специальный штатив в следующем порядке: слева – стандартные сыворотки 0(I)αβ группы (одна сзади другой), в середине – стандартные сыворотки А(II)β группы и справа – стандартные сыворотки В(III)α группы. В каждый флакон со стандартной сывороткой опускают сухую чистую глазную

пипетку.

 В штатив устанавливают пробирки или флаконы со стандартными эритроцитами в следующем порядке: слева группы 0(I), в середине – группы А(II) и справа – группы В(III).

 Для промывания стеклянных палочек в химический стаканчик наливают воду.

 В стаканчик с физраствором опускают глазную пипетку.

Техника определения

 Кровь для исследования берут из вены или пальца в сухую пробирку. Кровь

центрифугируют или оставляют стоять на 20-30 минут для отделения сыворотки. Для лучшего отделения сыворотки следует через 3-5 минут отделить сверток от стенок пробирки, обведя его стеклянной палочкой.

 Делают на пластинке обозначения стеклографом в соответствии с рисунком:

Фамилия, инициалы обследуемого анти А+В анти-В анти-А 0 А В

 В верхней части пластинки у соответствующих обозначений наносят по одной большой

капле (0,1мл) стандартных изогемагглютинирующих сывороток I-III групп двух разных

серий.

 В нижней части пластинки у соответствующих обозначений наносят по одной

маленькой капле (0,01мл) стандартных эритроцитов I-III групп крови.

 Из пробирки с исследуемой кровью осторожно, чтобы не взболтать эритроциты, пипеткой отсасывают сыворотку и наносят её по одной большой капле (0,1мл) на капли стандартных эритроцитов.

 Со дна пробирки этой же пипеткой набирают эритроциты и наносят их по одной маленькой капле (0,01мл) рядом с каждой их 6 капель стандартных сывороток.

 Перемешивают стеклянной палочкой во всех 9 каплях сыворотку с эритроцитами. После

перемешивания каждой капли палочку промывают в воде и насухо вытирают.

 Замечают время.

 В течение 3 минут периодически покачивают пластинку.

 Через 3 минуты в те капли, где наступила агглютинация, добавляют по 1 капле изотонического раствора NaCl и периодически покачивают пластинку еще в течение 2 минут.

 Через 5 минут после перемешивания капель оценивают результаты реакции.

**День 15(11.04.20)- Методический день**

**День 16(13.04.20)- Определение резус принадлежности крови**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗУС-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ ПРИ ПОМОЩИ ЦОЛИКЛОНА АНТИ-D СУПЕР

Принцип. Антиген D исследуемых эритроцитов выявляют реакцией агглютинации в солевой среде с моноклональными антителами анти-D, содержащимися в Цоликлоне анти D супер.

Реагенты.

1. Цоликлон анти-D супер;

2. Стандартные Rh(+) и rh(-) эритроциты – для контроля специфичности реакции.

Техника исследования

 Определение антигена D с помощью Цоликлонов анти-D супер можно производить в консервированной крови, в крови, взятой без консерванта, а также в крови из пальца.

 На пластину со смачиваемой поверхностью наносят большую каплю (около 0,1мл)

Цоликлона анти-D супер, а рядом - маленькую каплю (0,01-0,05мл) крови.

 Смешивают кровь с реагентом стеклянной палочкой.

 Ждут 20-30 секунд, а затем периодически покачивают пластинку.

 Через 3 минуты оценивают результаты реакции.

Трактовка результатов:

 При наличии агглютинации кровь оценивается как резус-положительная, а при

отсутствии агглютинации – как резус-отрицательная.

 Для контроля специфичности при каждом исследовании необходимо ставить реакцию со стандартными D-положительными и D-отрицательными эритроцитами. Результаты определения резус-принадлежности исследуемой крови учитывают как истинные только в том случае, если со стандартными резус-положительными эритроцитами реагент дал реакцию агглютинации, а со стандартными резус-отрицательными эритроцитами агглютинации нет.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗУС-ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ ПРИ ПОМОЩИ ЦОЛИКЛОНА АНТИ-D

Принцип. Антиген D исследуемых эритроцитов выявляют реакцией агглютинации в коллоидной среде с моноклональными антителами анти-D, содержащимися в Цоликлоне анти-D.

Реагенты.

1. Цоликлон анти-D;

2. 10% раствор желатина;

3. Изотонический раствор хлорида натрия;

4. Стандартные Rh(+) и rh(-) эритроциты для контроля специфичности реакции.

Техника исследования:

 Определение антигена D с помощью Цоликлона анти-D можно производить в

консервированной крови, в крови, взятой без консерванта, а также в крови из пальца.

 В агглютинационную пробирку вносят одну каплю (0,05-0,1мл) крови или свободных

эритроцитов из сгустка крови.

 Добавляют две капли (0,1-0,2 мл) 10% раствора желатина, предварительно прогретого

до при 45°С до разжижения, и одну каплю Цоликлона анти-D.

 Суспензию тщательно перемешивают и инкубируют при 48°С 10-15 минут в водяной

бане или 30 минут в термостате.

 Прибавляют 5-6мл изотонического раствора хлорида натрия и осторожно

переворачивают пробирку и визуально определяют наличие агглютинатов.

**День 17(14.04.20)-** **Утилизация отработанного материала.**

Согласно приказу 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами"

* Класс А - эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам (мебель, канцелярские пренадлежности, пищевые отходы, не имеющие контакта с био. Жидкостями));
* класс Б - эпидемиологически опасные отходы(материалы, инструменты загрязненные кровью, органические операционные отходы, патологоанатомические отходы);
* класс В - чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы(материалы, контактирующие с больными инфекционными болезнями, которые могут привести к возникновению ЧС, отходы загрязн. Мокротой, микробиологических лабораторий);
* класс Г - токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности(лек., диагностические, дез. Средства не подлежащие спользованию, ртуть содержащие предметы, приборы и оборудование);
* класс Д - радиоактивные отходы.

Сбор отходов класса А осуществляется в многоразовые ёмкости или одноразовые пакеты. Цвет пакетов может быть любой, за исключением жёлтого и красного. Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) / обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания / обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую и / или фармацевтическую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами. Отходы класса Б собираются в одноразовую мягкую (пакеты) или твёрдую (непрокалываемую) упаковку (контейнеры) жёлтого цвета или имеющие жёлтую маркировку. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов. Отходы класса В подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) физическими методами (термические, микроволновые, радиационные и другие). Применение химических методов дезинфекции допускается только для обеззараживания пищевых отходов и выделений больных, а также при организации первичных противоэпидемических мероприятий в очагах. Выбор метода обеззараживания (дезинфекции) осуществляется при разработке схемы сбора и удаления отходов. Вывоз необеззараженных отходов класса В за пределы территории организации не допускается. Отходы класса В собирают в одноразовую мягкую (пакеты) или твёрдую (непрокалываемую) упаковку (контейнеры) красного цвета или имеющую красную маркировку. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов. Жидкие биологические отходы, использованные одноразовые колющие (режущие) инструменты и другие изделия медицинского назначения помещают в твёрдую (непрокалываемую) влагостойкую герметичную упаковку (контейнеры). Использованные ртутьсодержащие приборы, лампы (люминесцентные и другие), оборудование, относящиеся к медицинским отходам класса Г, собираются в маркированные ёмкости с плотно прилегающими крышками любого цвета (кроме жёлтого и красного), которые хранятся в специально выделенных помещениях.

День 18 (15.04..20) -Методический день. Сдача дневников.