

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 200_ г. № _____

"УТВЕРЖДАЮ"
Директор ООО "МиниМед"
_____ Азбукин В.Р.
"25" _____ 200_ г.



**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ КРАСИТЕЛЯ АЗУР-ЭОЗИНА
ПО РОМАНОВСКОМУ
(МиниМед-Р)**

1. Назначение

Краситель МиниМед-Р предназначен для окраски форменных элементов крови в клинико-диагностических и биохимических лабораториях.

1 л красителя рассчитан на окрашивание 3000-6000 мазков крови при разведении красителя в 10-20 раз при расходе 3,0-3,5 мл рабочего раствора красителя на один препарат.

2. Характеристика фиксатора-красителя

2.1. Принцип метода

Метод окрашивания основан на том, что в результате взаимодействия с красителем форменные элементы крови приобретают специфическую окраску и это позволяет произвести подсчет их количества.

2.2. Состав фиксатора-красителя

- 0,76% раствор сухого красителя азур-эозин по Романовскому в смеси метанол-глицерин (1:1) – 1 бутылка (1л.);
- концентрат фосфатного буфера – 1 флакон (10 мл.)

3. Аналитические и диагностические характеристики фиксатора-красителя

- эритроциты – розовые с серым оттенком, бежево-коричневые;
- ядра лейкоцитов – фиолетовые;

- цитоплазма лимфоцитов – голубая
- цитоплазма моноцитов – сероватая, серо-голубая
- цитоплазма нейтрофилов – бледно-розовая, серо-розовая
- зернистость нейтрофилов – фиолетовая, красно-фиолетовая
- зернистость эозинофилов – желто-оранжевая, розово-фиолетовая
- зернистость базофилов – фиолетовая
- тромбоциты – розово-фиолетовые, розово-сине-фиолетовые.

Исследование лейкоцитарной формулы имеет большое значение в диагностике большинства гематологических заболеваний для оценки тяжести состояния и эффективности проводимой терапии.

4. Меры предосторожности

Потенциальный риск применения красителя – класс 3

В состав красителя входит метанол-яд, класс опасности III, токсичен при ингаляции, в контакте с кожными покровами и особенно при попадании внутрь. Огнеопасен. Концентрация паров метанола в помещении при использовании красителя не должна превышать ПДК = 5 мг/м³.

Меры предосторожности – соблюдение "Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР" (Москва, 1981 г.).

При работе с красителем следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. Оборудование, материалы, реагенты:

- микроскоп МПБ-3 (ТУ 3-3.2182-89);
- ареометр общего назначения с ценой деления 0,001 г/см³ (ГОСТ 18481-81);
- рН-метр, обеспечивающий точность измерения $\pm 0,1$;
- цилиндр стеклянный для ареометров (ГОСТ 18481-81) с внутренним диаметром не менее 30 мм;
- секундомер (ТУ 25-1894.003-90);
- колба коническая вместимостью 250 мл (ГОСТ 25336-82);
- стекла предметные (ГОСТ 9284-75);
- колбы мерные вместимостью 1000 мл и 2000 мл (ГОСТ 1770-74);
- колба вместимостью 200 мл (ГОСТ 25336-82);

- цилиндры мерные вместимостью 100 и 500 мл (ГОСТ 1770-74);
- пипетка, позволяющая отбирать объемы жидкости 0,5 мл (ГОСТ 29227-91);
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);
- перчатки резиновые (ГОСТ-88) или пластиковые (ТУ 38.106234-84);
- метанол-яд (ГОСТ 2222-95);
- пипетка 2-1-2-0,1 (ГОСТ 29227-91);
- пипетка 2-2-2-5 (ГОСТ 29227-91);
- цельная кровь человека;
- масло иммерсионное терпеновое (ТУ 13-0281172-16-87)

6. Анализируемые пробы

Мазки крови, приготовленные из цельной крови или крови с антикоагулянтами.

7. Проведение анализа

7.1 Приготовление рабочих растворов

7.1.1. Приготовление концентрированного фосфатно-буферного раствора.

К 2 л дистиллированной воды добавить 1,0 мл концентрированного фосфатного буфера и перемешать. Измерить pH полученного раствора в соответствии с Инструкцией, прилагаемой к прибору. pH должен быть в диапазоне 6,4-7,0.

Полученный раствор можно хранить при комнатной температуре не более 8 часов.

7.1.2. Приготовление рабочих растворов красителя.

7.1.3. Приготовление рабочего раствора красителя №1 (разведение 1:9).

В колбу коническую с притертой пробкой вместимостью 200 мл внести 90 мл дистиллированной воды, добавить 0,1 мл концентрата фосфатного буфера и 10 мл красителя, закрыть колбу пробкой и быстро 5-6 раз взболтать до полного перемешивания жидкостей (при медленном смешивании жидкостей краситель легко образует осадок). pH полученного раствора должен быть в диапазоне 6,4-7,0.

Рабочий раствор красителя №1 готовят непосредственно перед окрашиванием мазков.

Рабочий раствор красителя №1 можно хранить при комнатной температуре (18-25°C) в плотно закрытой колбе в защищенном от света месте

не более 8 часов.

7.1.4. Приготовление рабочего раствора красителя №2 (разведение 1:19).

В колбу коническую с притертой пробкой вместимостью 200 мл внести 95 мл дистиллированной воды, добавить 0,05 мл концентрата фосфатного буфера и 5 мл красителя, закрыть колбу пробкой и быстро 5-6 раз взболтать до полного перемешивания жидкостей (при медленном смешивании жидкостей краситель легко образует осадок). рН полученного раствора должен быть в диапазоне 6,4-7,0.

Рабочий раствор красителя №2 готовят непосредственно перед окрашиванием мазков.

Рабочий раствор красителя №2 можно хранить при комнатной температуре в плотно закрытой колбе в защищенном от света месте не более 8 часов.

7.2. Приготовление мазков крови.

Мазки крови готовят на предварительно вымытых и обезжиренных предметных стеклах с помощью более узкого шлифованного стекла.

Взяв предметное стекло за длинные края, прикоснуться его поверхностью (отступив на 0,5-1 см от узкого края) к капле крови (но не к коже). Предметное стекло следует держать на столе или в левой руке за узкие края. Правой рукой приставить шлифованное стекло узким краем к стеклу с кровью слева от капли под углом 45° и продвинуть его вправо до соприкосновения с каплей крови. Выждать до тех пор, пока кровь расплывется по всему ребру шлифованного стекла, и затем легким быстрым движением провести его справа налево до тех пор, пока не будет исчерпана вся капля. Капля крови должна быть небольшой и соразмерна так, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя 1 – 1,5 см до его края. Нельзя сильно нажимать на стекло, так как многие клетки крови могут оказаться поврежденными.

Правильно сделанный мазок должен быть равномерно тонким, занимать примерно 2/3 длины предметного стекла, иметь желтоватый цвет и заканчиваться «метелочкой».

После приготовления мазки следует быстро высушить на воздухе до исчезновения влажного блеска; при медленном высыхании возможно изменение морфологии клеток крови.

7.3. Проведение анализа.

7.3.1. Определение плотности раствора красителя.

Краситель поместить в чистый сухой цилиндр так, чтобы уровень жидкости не доходил до верхнего его края на 3-4 см. Цилиндр установить на ровной поверхности, в него осторожно опустить чистый сухой ареометр, шкала которого соответствует ожидаемому значению плотности. Расстояние от нижнего конца ареометра, погруженного в жидкость, до дна цилиндра должна быть не менее 3 см.

Ареометр не выпускать из рук до тех пор, пока он не станет плавать, не касаясь стенок и дна цилиндра.

Когда прекратятся колебания ареометра, считать его показания по нижнему краю мениска.

За результат контроля принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

7.3.2. Определение времени наступления окраски мазка.

Положить высушенные препараты крови мазками вверх на стеклянный мостик для окраски, налить на нефиксированные мазки метанол так, чтобы он покрыл весь мазок, и фиксировать в течение 2-3 минут. После этого метанол слить, а мазки высушить.

Фиксированные мазки крови (8 шт) поместить на стеклянный мостик для окраски. На 4 мазка нанести 3-3,5 мл рабочего раствора красителя №1 и окрашивать мазки в течение 10, 15, 20 и 25 минут. На другие 4 мазка нанести 3-3,5 мл рабочего раствора красителя №2 и окрашивать мазки в течение 20, 30, 40 и 50 минут. Окрашенные мазки промыть рабочим раствором фосфатного буфера для промывки мазков крови (см п.7.1.1.), водопроводной или дистиллированной водой, высушить на воздухе и микроскопировать с иммерсионным маслом. Время окрашивания устанавливают по хорошо окрашенному препарату.

7.3.4. Определение окраски форменных элементов крови.

Для проведения контроля использовать 4 мазка крови.

Положить высушенные препараты крови мазками вверх на стеклянный мостик для окраски, налить на нефиксированные мазки метанол так, чтобы он покрыл весь мазок, и фиксировать в течение 2-3 минут. После этого метанол слить, мазки высушить.

На первые 2 мазка нанести 3-3,5 мл рабочего раствора красителя №1 (разведение 1:9) (см п. 7.1.3.). Время окрашивания мазка 10-25 минут.

На другие 2 мазка нанести 3-3,5 мл рабочего раствора красителя №2 (разведение 1:19) (см 7.1.4.). Время окрашивания мазка 20-50 минут.

По истечении указанного времени препараты крови промыть рабочим раствором фосфатного буфера для промывки мазков (см п.7.1.1.) или дистиллированной водой (рН 6,4-7,0), высушить и микроскопировать с использованием иммерсионного масла.

8. Регистрация результатов

Микроскопию окрашенных препаратов производят с иммерсионной системой (объектив 90×, окуляр 10×).

9. Учет результатов

Лейкоцитарную формулу (процентное соотношение различных видов лейкоцитов) подсчитывают в окрашенных мазках крови. Необходимо просчитывать не менее 100 лейкоцитов. Если при подсчёте 100 лейкоцитов отмечаются какие-либо отклонения от нормы (например, увеличение числа палочкоядерных форм, эозинофилов, лимфоцитов или появление лейкоцитов, не обнаруживаемых у здоровых людей), необходимо подсчитать ещё 100 лейкоцитов и вывести средний результат.

10. Условия хранения и эксплуатации фиксатора-красителя

Хранение красителя азур-эозин по Романовскому в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться в крытых вентилируемых помещениях в темном месте вдали от кислот и щелочей при температуре от 0 до 25°C в течение всего срока годности.

Срок годности красителя-фиксатора – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

По вопросам, касающимся качества красителя азур-эозин по Романовскому, следует обращаться по адресу: Россия, 241520, г. Брянск, Супонево, ул. Шоссейная, 17А, ООО «МиниМед» тел/факс (4832) 92-97-97, 92-24-52

Начальник ОТК ООО "МиниМед" _____ *Захаров* Захаров

«25» *марта* 2011 г.



«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой лабораторной
диагностики ГОУ ДПО РМАПО
Росздравнадзора, д.м.н., профессор

В. В. Долгов В. В. Долгов

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения
и социального развития

Р.У. Хабриев

« 7 » _____ 2006 г.

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ КРАСИТЕЛЯ АЗУР-ЭОЗИНА
ПО РОМАНОВСКОМУ
(МиниМед-Р)**

Рекомендована к утверждению Научно-экспертным Советом по медицинским изделиям.

Назначение

Краситель МиниМед-Р предназначен для окраски форменных элементов крови в клинико-диагностических и биохимических лабораториях.

1 л красителя рассчитан на окрашивание 3000-6000 мазков крови при разведении красителя в 10-20 раз при расходе 3,0-3,5 мл рабочего раствора красителя на один препарат.

Принцип метода

Метод окрашивания основан на том, что в результате взаимодействия с красителем форменные элементы крови приобретают специфическую окраску и это позволяет произвести подсчет их количества.

Состав

- 0,76% раствор сухого красителя азур-эозин по Романовскому в смеси метанол-глицерин (1:1) – 1 бутылка (1 л);
- концентрат фосфатного буфера - 1 флакон (10 мл).

Меры предосторожности

Потенциальный риск применения красителя – класс 3.

В состав красителя входит метанол-яд, класс опасности III, токсичен при ингаляции, контакте с кожными покровами и особенно при попадании внутрь. Огнеопасен. Концентрация паров метанола в помещении при использовании красителя не должна превышать ПДК = 5 мг/м³.

Инструкция составлена заведующим химической лабораторией ООО «МиниМед» В.А. Бабичем.

