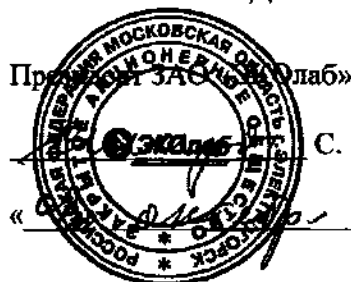


УТВЕРЖДЕНА

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г. № _____



С. Г. Марданлы

2008 г.

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРОВИ
(«Клиника – Кровь»)**

1. Назначение

Набор предназначен для проведения общего анализа крови унифицированными методами: подсчет форменных элементов (эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов), определение скорости оседания эритроцитов, определение лейкоцитарной формулы в клиничко - диагностических лабораториях.

Набор рассчитан на анализ 4000 образцов крови.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип метода

Подсчет форменных элементов крови - эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, ретикулоцитов

Подсчет количества эритроцитов и лейкоцитов под микроскопом в определенном количестве квадратов счётной камеры Горяева и расчёт их количества на 1 мкл (1 л) крови, с учётом разведения крови и объёма счётной камеры.

В качестве разводящей жидкости при подсчёте эритроцитов используют 0,9 % раствор натрия хлористого, лейкоцитов – 3 % раствор уксусной кислоты.

Содержание тромбоцитов и ретикулоцитов определяют микроскопически подсчетом их числа, приходящегося на 1000 эритроцитов в окрашенных мазках крови.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ)

Свойство крови, смешанной с цитратом натрия, не свёртываться при стоянии, а разделяться на два слоя: нижний – эритроциты, верхний – плазма. Расслоение происходит с различной скоростью в зависимости от изменения химических и физических свойств крови.

Лейкоцитарная формула - относительное содержание различных форм лейкоцитов, определяют микроскопически при подсчете 100-200 лейкоцитов в окрашенном мазке крови.

2.2 Состав набора

Реагент 1. - Натрий хлористый - п/э пакет (150 г);

Реагент 2. - Кислота уксусная, 33 % - 2 флакона (по 100 мл);

Реагент 3. - Трилон Б - п/э пакет (60 г).

Реагент 4. - Натрий лимоннокислый 5,5-водный - п/э пакет (100 г);

Реагент 5. - Фосфатный буфер (сухая смесь) - 6 флаконов (по 5,55 г);

Реагент 6. - Фиксатор краситель эозин - метиленовый синий по Май - Грюнвальду (в растворе) - 1 флакон (1,0 л);

Реагент 7. - Краситель азу-эозин по Романовскому (в растворе) - 1 флакон (1,0 л);

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

Эритроциты

Повышение количества эритроцитов в крови – эритроцитоз может быть обусловлен многими причинами. Снижение числа эритроцитов в крови является одним из основных лабораторных критериев анемии.

Лейкоциты

Повышенное количество лейкоцитов – лейкоцитоз наблюдается при различных воспалительных процессах, острых бактериальных инфекциях, шоке, острых кровопотерях, коматозных состояниях, гемолитическом кризе, почечной колике, аллергических реакциях, опухолях. Снижение количества лейкоцитов – лейкопения наблюдается при вирусных инфекциях, сепсисе, циррозе печени, хроническом активном гепатите, аутоиммунных заболеваниях.

Тромбоциты

Тромбоциты в мазках окрашиваются в розовато – фиолетовый цвет, имеют округлую форму, размер 2 – 4 мкм, в центре клетки отчетливо определяется зернистость – грануломер, периферическая часть имеет более светлую окраску, незернистая – гиаломер.

Повышение количества тромбоцитов в крови – тромбоцитоз характерно для миело-пролиферативных заболеваний, наблюдается при злокачественных новообразованиях. Снижение количества тромбоцитов в крови – тромбоцитопения является важным симптомом при некоторых формах геморрагического диатеза. Тромбоцитопения обычно сопутствует острым лейкозам в развёрнутой стадии.

Ретикулоциты

Клетки крови должны иметь следующую окраску:

- эритроциты – желтовато-зеленоватый цвет;
- зернисто-сетчатая субстанция – синий или фиолетово-синий цвет.

Число ретикулоцитов в крови отражает регенеративные свойства костного мозга. Повышение количества ретикулоцитов наблюдается после кровопотери, при гемолитических анемиях. Снижение количества ретикулоцитов характерно для гипопластической анемии.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ)

Увеличение СОЭ наблюдается при различных воспалительных процессах, интоксикациях, острых и хронических инфекциях, при инфаркте миокарда, опухолях, после кровопотери, оперативных вмешательствах.

Лейкоцитарная формула

Форменные элементы крови должны иметь следующую окраску:

эритроциты – розовый или розовый с серым оттенком цвет;

лейкоциты:

нейтрофилы – ядра - фиолетовый цвет, цитоплазма - бледно-розовый, или розовый, или розово-серый цвет, зернистость цитоплазмы - светло-фиолетовый цвет;

эозинофилы — ядра - фиолетовый цвет, цитоплазма - слабо-голубой цвет, зернистость цитоплазмы - оранжево-красный или кирпично-красный цвет;

базофилы — ядра - фиолетовый цвет, цитоплазма – бледно-розовый или светло-фиолетовый цвет, зернистость цитоплазмы – цвет от темно-фиолетового до черного;

лимфоциты — ядра - фиолетовый цвет, цитоплазма – голубой, или серо-голубой, или светло-синий, или серовато-синий цвет;

моноциты — ядра - светло-фиолетовый цвет, цитоплазма – серый или серо-голубой цвет;

тромбоциты:

грануломер – красновато-фиолетовый, или темно-фиолетовый или фиолетовый с серым оттенком цвет;

гиаломер – голубой, или фиолетовый, или розовато-сиреневый или серо-синий цвет.

Изменения лейкоцитарной формулы сопутствуют многим заболеваниям и нередко являются неспецифическими. Тем не менее диагностическое значение этого исследования велико, оно даёт представление о тяжести состояния, эффективности терапии.

4. Меры предосторожности при работе с набором

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

В состав набора входят кислота уксусная, метиловый спирт. При работе с ними следует соблюдать осторожность и не допускать попадания на кожу и слизистые; при попада-

нии немедленно промыть пораженное место большим количеством проточной воды. При проглатывании следует выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

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

При работе с набором 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 и реагенты:

- Аппарат Панченкова;
- весы технические лабораторные;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- рН-метр;
- микроскоп;
- секундомер;
- камера Горяева;
- цилиндры мерные вместимостью 25 мл и 250 мл;
- пробирка Видаля;
- пробирки стеклянные вместимостью 10 мл;
- лоток для окраски мазков;
- штатив («рельсы») для окраски мазков на предметных стеклах;
- пинцет или щипцы для взятия предметных стекол с мазками
- штатив для просушивания окрашенных стекол на воздухе;
- воронка лабораторная;
- стекла предметные;
- стекла со шлифованным краем;
- колбы мерные вместимостью 100 мл и 1,0 л;
- микропипетки на 0,02 мл;
- пипетки стеклянные вместимостью 1,0 и 5,0 мл;
- фильтровальная бумага;
- вода дистиллированная;
- масло иммерсионное;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. Анализируемые пробы

Капиллярная кровь.

Нормальные значения:

Количество эритроцитов в крови составляет у мужчин $- 4,0 \times 10^{12} - 5,1 \times 10^{12}/\text{л}$, у женщин $- 3,7 \times 10^{12} - 4,7 \times 10^{12}/\text{л}$.

Количество лейкоцитов в крови - 4000 – 8800 в 1 мкл, или $4,0 \times 10^9 - 8,8 \times 10^9$ в 1 л.

Количество тромбоцитов в крови составляет $180 - 320 \times 10^9/\text{л}$, ретикулоцитов - 0,2 – 1,2 %.

СОЭ: у мужчин 1 – 10 мм/ч, у женщин 2 – 15 мм/ч.

7. Проведение анализа

7.1. Приготовление рабочих растворов реагентов

7.1.1. Приготовление раствора натрия хлористого, 0,9 % (9,0 г/л)

В мерную колбу вместимостью 1000 мл внести навеску 9,0 г Реагента 1 – натрия хлористого, прилить 800 – 900 мл воды дистиллированной, растворить при перемешивании и довести объём раствора до метки водой дистиллированной.

Рабочий раствор натрия хлористого можно хранить при комнатной температуре (18-25) °С в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора

7.1.2. Приготовление рабочего раствора уксусной кислоты, 3,0 %

Реагент 2 – раствор уксусной кислоты 33 %, разбавить дистиллированной водой в соотношении 1:10.

Рабочий раствор уксусной кислоты, 3,0 % можно хранить при комнатной температуре в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора.

7.1.3. Приготовление раствора трилона Б (ЭДТА), 60 г/л

В мерную колбу вместимостью 100 мл внести 6,0 г Реагента 3 – трилона Б прилить 80 – 90 мл воды дистиллированной, растворить при перемешивании, довести объём раствора до метки водой дистиллированной.

Рабочий раствор трилона Б можно хранить при комнатной температуре в плотно закрытом флаконе в течение года.

7.1.4. Приготовление раствора натрия лимоннокислого, 50 г/л (цитрата натрия)

В мерную колбу вместимостью 100 мл внести 5,0 г Реагента 4 – натрия лимоннокислого 5,5-водного (цитрат натрия), прилить 80 – 90 мл воды дистиллированной, растворить при перемешивании, довести объём раствора до метки водой дистиллированной и при необходимости отфильтровать.

Раствор натрия лимоннокислого должен иметь нейтральную или слабощелочную реакцию (по лакмусовой пробе).

Раствор натрия лимоннокислого нестойк (при помутнении – заменить свежим) можно хранить при температуре (2-8) °С в плотно закрытом флаконе не более месяца.

7.1.5. Приготовление фосфатного буферного раствора, pH 6,8 – 7,2

К содержимому флакона с Реагентом 5 добавить 20 мл дистиллированной воды, растворить при перемешивании. Полученный концентрат смешать с дистиллированной водой в соотношении 1:250.

Концентрат фосфатного буферного раствора можно хранить при температуре (2-8) °С в течение года.

Фосфатный буферный раствор можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 3 месяцев, при комнатной температуре (18-25) °С - не более месяца в плотно закрытом флаконе.

7.1.6. Реагент 6 – Фиксатор краситель эозин - метиленовый синий по Май - Грюнвальду (в растворе) - готов к применению.

Реагент 6 можно хранить при комнатной температуре (18-25) °С в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора.

7.1.7. Приготовление рабочего раствора красителя азур - эозин по Романовскому

Реагент 7 - краситель азур – эозин по Романовскому разбавить фосфатным буферным раствором (см п 7.1.5) в соотношении 1:10 - 1:20.

Рабочий раствора красителя азур – эозин по Романовскому стабилен при комнатной температуре в течение 8 часов.

7.2. Приготовление мазков крови

Мазки крови приготовить на предметных стеклах с помощью более узких стекол со шлифованным краем. Предметное стекло взять за длинные края и прикоснуться его поверхностью, отступив на 0,5-1,0 см от узкого края, к капле крови. Предметное стекло следует положить на стол или держать в левой руке за края. Правой рукой приставить стекло со шлифованным краем к предметному стеклу под углом 45° и подвести к капле крови до соприкосновения с ней. После того как кровь растечётся по всему шлифованному краю, стеклом сделать скользящее движение справа налево, равномерно распределяя кровь на стекле тонким слоем, до тех пор, пока не будет исчерпана вся капля. Мазок должен занимать 2/3 поверхности предметного стекла, иметь четкие границы и заканчиваться "щеточкой" ("метелочкой").

Толщина мазка зависит от величины угла между стеклами: чем острее угол, тем тоньше мазок. Правильно приготовленный мазок имеет желтоватый цвет и одинаковую толщину по всей поверхности.

Нельзя сильно нажимать на стекло, так как это может привести к повреждению форменных элементов крови.

После приготовления мазки крови необходимо быстро высушить на воздухе до исчезновения влажного блеска; при медленном высыхании может измениться морфология клеток.

7.3 Проведение анализа

7.3.1. Определение количества эритроцитов

В сухую пробирку отмерить 4 мл раствора натрия хлористого, 0,9 %. Пипеткой отобрать 20 мкл исследуемой крови, кончик пипетки осторожно вытереть, выдуть кровь на дно пробирки и тщательно промыть пипетку в верхнем слое жидкости. Содержимое пробирки перемешать и одну каплю его внести в камеру Горяева, следя за тем, чтобы жидкость целиком заполнила пространство над сеткой без пузырьков воздуха и без затекания в бороздки камеры. Заполненную камеру оставить в горизонтальном положении на 1 мин для оседания эритроцитов.

7.3.2. Определение количества лейкоцитов

В сухую видалевскую пробирку внести 0,4 мл раствора уксусной кислоты (3 %). Пипеткой отобрать 20 мкл крови, кончик пипетки тщательно обтереть, выдуть кровь из пипетки на дно пробирки и промыть пипетку верхним слоем раствора уксусной кислоты. Содержимое пробирки осторожно перемешать (не допуская образования пены) стеклянной палочкой, отобрать одну каплю смеси и заполнить камеру Горяева, следя за тем, чтобы жидкость целиком заполнила пространство над сеткой без пузырьков воздуха и без затекания в бороздки камеры. Заполненную камеру оставить в горизонтальном положении на 1 мин для оседания лейкоцитов.

7.3.3. Определение количества тромбоцитов в мазках крови по Фонио

Капилляром Панченкова набрать рабочий раствор трилона Б до метки "75" и внести в пробирку вместимостью 10 мл. Тем же капилляром отобрать кровь до метки "0", влить в пробирку, тщательно перемешать и приготовить тонкие мазки на предметных стеклах. Мазки зафиксировать и красить рабочим раствором азур-эозина по Романовскому в течение 30-45 мин.

7.3.4. Определение количества ретикулоцитов

Смешать в пробирке раствор бриллиантового крезилового синего и периферическую кровь в соотношении 1:1.

Для определения использовать набор реагентов «Раствор бриллиантового крезилового синего для окраски ретикулоцитов в крови», производства ЗАО «ЭКОлаб».

7.3.5. Определение СОЭ микрометодом Панченкова

В капиллярную пипетку, предварительно промытую раствором натрия лимоннокислого, набрать этот раствор до метки "Р" и выдуть его в видалевскую пробирку. Тем же капилляром из пальца дважды набрать кровь до метки "К", выпуская ее в ту же пробирку. Хорошо перемешать и набрать смесь в капилляр до метки "О"; заметив время, поместить пипетку в штатив Панченкова строго вертикально. Через 1 час по делениям на капиллярной пипетке определить величину столбика отстоявшейся плазмы.

СОЭ выражать в мм/ч.

7.3.6. Фиксация и окраска мазков крови

На высушенные мазки крови налить с помощью пипетки фиксатор краситель ЭКОлаб-Гем-Май-Грюнвальд, так чтобы он покрыл весь мазок (1,0-1,2) мл, выдержать в течение 3-5 минут. После окончания фиксации фиксатор смыть фосфатным буферным раствором. На зафиксированные мазки крови с помощью пипетки налить рабочий раствор азур-эозина по Романовскому, так чтобы он покрыл весь мазок (1,3-1,5) мл, выдержать в течение 15-40 минут. По окончании окрашивания промыть мазки крови водопроводной водой, высушить на воздухе и микроскопировать.

Время окрашивания и концентрацию рабочего раствора подобрать предварительно на нескольких фиксированных мазках, окрашивая их в течение 15 - 40 мин. различными разведениями красителя фосфатным буферным раствором 1:10 – 1:20.

8. Регистрация результатов

Подсчёт клеток

Не меняя горизонтального положения, камеру поместить на столик микроскопа и с помощью малого увеличения (объектив 8х, окуляр 10х или 15х) найти верхний левый край сетки.

Эритроциты считать в 5 больших (80 малых) квадратах, расположенных по диагонали. При подсчете учитывать только эритроциты, лежащие внутри квадрата или на левой и верхней его линиях.

Лейкоциты считать в 100 больших (1600 малых) квадратах, используя объектив 8х, окуляр 10х или 15х.

Условия подсчета те же, что при подсчете эритроцитов.

Тромбоциты

Подсчёт количества тромбоцитов на 1000 эритроцитов в окрашенных мазках крови

Ретикулоциты

Необходимо подсчитать не менее 1000 эритроцитов (большая точность получается при подсчете 2000 – 3000 эритроцитов) и отметить среди них количество эритроцитов, содержащих зернисто-сетчатую субстанцию.

СОЭ

Определяют по скорости расслоения цитратной крови в капиллярной пипетке.

Скорость оседания измеряется в мм за час.

Лейкоцитарная формула

Микроскопирование окрашенных препаратов производят с иммерсионной системой (объектив 90х, окуляр 10х).

9. Учет результатов

Количество эритроцитов в 1 мкл крови рассчитать по формуле (1):

$$X = \frac{a \times 4000 \times 200}{80} = a \times 10^4 \quad (1),$$

где X – количество эритроцитов в 1 мкл крови;

a – количество сосчитанных эритроцитов;

200 – степень разведения крови;

80 – количество просчитанных малых квадратов;

1/4000 – объём малого квадрата в мкл.

Количество лейкоцитов рассчитать по формуле (2):

$$X = \frac{a \times 250 \times 20}{100} = a \times 50 \quad (2)$$

где X – количество лейкоцитов в 1 мкл крови;

a – количество лейкоцитов в 100 больших квадратах;

20 – разведение крови;

100 – количество больших квадратов;

250 – коэффициент пересчёта на 1 мкл.

Количество тромбоцитов в 1 мкл крови рассчитать по формуле (3):

$$X = \frac{a \times e}{1000} \quad (3);$$

где X – количество тромбоцитов в 1 мкл крови;

a – количество тромбоцитов, подсчитанных в мазке крови на 1000 эритроцитов;

e – количество эритроцитов в 1 мкл крови;

1000 – количество эритроцитов, подсчитанных в мазках крови.

Лейкоцитарную формулу - процентное соотношение различных видов лейкоцитов, подсчитывают в окрашенных мазках крови. Необходимо просчитывать не менее 100 лейкоцитов. Если при подсчете 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 еще 100 лейкоцитов и вывести средний результат.

Условия хранения и эксплуатации набора

Набор должен храниться в упаковке предприятия - изготовителя при комнатной температуре (18-25) °С в течение всего срока годности.

Срок годности – 1,5 года.

Раствор натрия хлористого, 0,9 % можно хранить при комнатной температуре в плотно закрытом флаконе в течение года.

Рабочий раствор уксусной кислоты, 3 % можно хранить при комнатной температуре в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора.

Раствор трилона Б можно хранить при температуре (2-8) °С в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора.

Раствор натрия лимоннокислого (цитрата натрия) нестойк, можно хранить при температуре (2-8) °С в плотно закрытом флаконе не более месяца.

Концентрат фосфатного буферного раствора можно хранить при температуре (2-8) °С в течение года.

Фосфатный буферный раствор можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 3 х месяцев, при комнатной температуре - не более месяца в плотно закрытом флаконе.

Рабочий раствор красителя азур – эозин по Романовскому стабилен при комнатной температуре в течение 8 часов.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора «Клиника – Кровь», следует обращаться в ЗАО «ЭКОлаб» по адресу: 142530, Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1; тел. (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, факс (49643) 3-30-85.

Начальник лаборатории
биохимии ЗАО «ЭКОлаб»

Т. М. Сиренко

«СОГЛАСОВАНО»
Зав. Кафедрой лабораторной
Диагностики ГОУ ДПО РМАПО
Росздравнадзора, д.м.н., профессор

В. В. Долгов

Лейкоцитарную формулу - процентное соотношение различных видов лейкоцитов, подсчитывают в окрашенных мазках крови. Необходимо просчитывать не менее 100 лейкоцитов. Если при подсчете 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 еще 100 лейкоцитов и вывести средний результат.

Условия хранения и эксплуатации набора

Набор должен храниться в упаковке предприятия - изготовителя при комнатной температуре (18-25) °C в течение всего срока годности.

Срок годности – 1,5 года.

Раствор натрия хлористого, 0,9 % можно хранить при комнатной температуре в плотно закрытом флаконе в течение года.

Рабочий раствор уксусной кислоты, 3 % можно хранить при комнатной температуре в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора.

Раствор трилона Б можно хранить при температуре (2-8) °C в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора.

Раствор натрия лимоннокислого (цитрата натрия) нестойк, можно хранить при температуре (2-8) °C в плотно закрытом флаконе не более месяца.

Концентрат фосфатного буферного раствора можно хранить при температуре (2-8) °C в течение года.

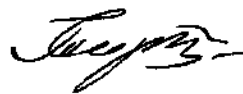
Фосфатный буферный раствор можно хранить при температуре (2-8) °C в течение 3 х месяцев, при комнатной температуре - не более месяца в плотно закрытом флаконе.

Рабочий раствор красителя азур – эозин по Романовскому стабилен при комнатной температуре в течение 8 часов.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора «Клиника – Кровь», следует обращаться в ЗАО «ЭКОлаб» по адресу: 142530, Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1; тел. (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, факс (49643) 3-30-85.

Начальник лаборатории
биохимии ЗАО «ЭКОлаб»



Т. М. Сиренко

СОГЛАСОВАНО:

Генеральный директор
ЗАО «Вымпел-Медцентр»
кандидат мед. наук

