Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фармацевтический колледж

### Дневник

производственной практики

по **ПМ 02.«** Проведение лабораторных гематологических исследований**»**

Лебедева Полина Юрьевна

ФИО

Место прохождения практики

КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А. И. Крыжановского», клинико-диагностическая лаборатория

(медицинская организация, отделение)

с «26» марта 2020 г. по «15» апреля 2020 г.

Руководители практики:

Общий – Ф.И.О. (его должность) Якунина Е. Ю., заведующий КДЛ

Непосредственный – Ф.И.О. (его должность) Мельман Н. А. ,старший фельдшер-лаборант

Методический – Ф.И.О. (его должность) Букатова Е. Н., преподаватель

Красноярск, 2020

## **Содержание**

## 1. Цели и задачи практики

## 2. Знания, умения, практический опыт, которыми должен овладеть студент после прохождения практики

## 3. Тематический план

4. График прохождения практики

5. Инструктаж по технике безопасности

6. Содержание и объем проведенной работы

7. Манипуляционный лист (Лист лабораторных / химических исследований)

8. Отчет (цифровой, текстовой)

## **Цели и задачи практики:**

1. Закрепление в производственных условиях профессиональных умений и навыков по методам гематологических исследований.
2. Расширение и углубление теоретических знаний и практических умений по методам гематологических исследований.
3. Повышение профессиональной компетенции студентов и адаптации их на рабочем месте, проверка возможностей самостоятельной работы.
4. Осуществление учета и анализ основных клинико-диагностических показателей, ведение документации.
5. Воспитание трудовой дисциплины и профессиональной ответственности.
6. Изучение основных форм и методов работы в гематологических лабораториях.

**Программа практики.**

 *В результате прохождения практики студенты должны уметь самостоятельно:*

1. Организовать рабочее место для проведения лабораторных исследований.
2. Подготовить лабораторную посуду, инструментарий и оборудование для анализов.
3. Приготовить растворы, реактивы, дезинфицирующие растворы.
4. Провести дезинфекцию биоматериала, отработанной посуды, стерилизацию инструментария и лабораторной посуды.
5. Провести прием, маркировку, регистрацию и хранение поступившего биоматериала.
6. Регистрировать проведенные исследования.
7. Вести учетно-отчетную документацию.
8. Пользоваться приборами в лаборатории.
9. Выполнять методики определения веществ согласно алгоритмам

**По окончании практики студент должен**

**представить в колледж следующие документы:**

1. Дневник с оценкой за практику, заверенный подписью общего руководителя и печатью ЛПУ.
2. Характеристику, заверенную подписью руководителя практики и печатью ЛПУ.
3. Текстовый отчет по практике (положительные и отрицательные стороны практики, предложения по улучшению подготовки в колледже, организации и проведению практики).
4. Выполненную самостоятельную работу.

**В результате производственной практики обучающийся должен:**

**Приобрести практический опыт:**

проведения общего анализа крови и дополнительных методов исследований ручными методами и на гематологических анализаторах;

**уметь:**

производить забор капиллярной крови для лабораторного исследования;

- готовить рабочее место для проведения общего анализа крови и дополнительных исследований;

- проводить общий анализ крови и дополнительные исследования

- дезинфицировать отработанный биоматериал и лабораторную посуду;

- работать на гематологических анализаторах

**знать:**

-задачи, структуру, оборудование, правила работы и техники безопасности в гематологической лаборатории;

- теорию кроветворения; морфологию клеток крови в норме;

- понятия «эритроцитоз» и «эритропения»; «лейкоцитоз» и «лейкопения»; «тромбоцитоз» и «тромбоцитопения»;

- изменения показателей гемограммы при реактивных состояниях, при заболеваниях органов кроветворения (анемии, лейкозах, геморрагических диатезах и др. заболеваниях);

- морфологические особенности эритроцитов при различных анемиях;

- морфологические особенности лейкоцитов при различных патологиях

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№** | **Наименование разделов и тем практики** | **Всего часов** |
|
|
| **6семестр** | **108** |
| 1 | *Ознакомление с правилами работы в КДЛ:* - изучение нормативных документов, регламентирующих санитарно-противоэпидемический режим в КДЛ. | 6 |
| 2 | *Забор капиллярной крови* для общего анализа крови | 6 |
| 3 | *Организация рабочего места:*- приготовление реактивов, подготовка оборудования, посуды для исследования | 6 |
| 4 | *Определение гематологических показателей* *-*определение гемоглобина-определение СОЭ-определение количества лейкоцитов-определение количества эритроцитов-приготовление мазка крови-окрашивание мазков крови-подсчёт лейкоцитарной формулы- супровитальная окраска ретикулоцитов-подсчет ретикулоцитов в мазке крови-определение гематокрита -определение длительности кровотечения - определение время свёртывания крови-определение количества тромбоцитов-определение осмотической стойкости эритроцитов-определение гематологических показателей на гематологическом анализаторе- определение групп крови-определение резус принадлежности крови | 78 |
| 5 | *Регистрация результатов исследования.* | 6 |
| 6 | *Выполнение мер санитарно-эпидемиологического режима в КДЛ:*- проведение мероприятий по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты; - утилизация отработанного материала. | 6 |
| **Вид промежуточной аттестации** | Дифференцированный зачет |  |
|  **Итого** | **108** |

**График прохождения практики**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **№ п/п** | **Дата** | **Часы** | **оценка** | **Подпись руководителя** |
| 1 | 26.03.2020 | 6  |  |  |
| 2 | 27.03.2020 | 6 |  |  |
| 3 | 28.03.2020 | Методический день |
| 4 | 30.03.2020 | 6 |  |  |
| 5 | 31.03.2020 | 6 |  |  |
| 6 | 01.04.2020 | 6 |  |  |
| 7 | 02.04.2020 | 6 |  |  |
| 8 | 03.04.2020 | 6 |  |  |
| 9 | 04.04.2020 | Методический день |
| 10 | 06.04.2020 | 6 |  |  |
| 11 | 07.04.2020 | 6 |  |  |
| 12 | 08.04.2020 | 6 |  |  |
| 13 | 09.04.2020 | 6 |  |  |
| 14 | 10.04.2020 | 6 |  |  |
| 15 | 11.04.2020 | Методический день |
| 16 | 13.04.2020 | 6 |  |  |
| 17 | 14.04.2020 | 6 |  |  |
| 18 | 15.04.2020 | Защита дневника производственной практики |

**Лист лабораторных исследований.**

**6/8 семестр**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Исследования |  | Количество исследований по дням практики | итог |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |  |
| определение гемоглобина |  | 3 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| определение СОЭ |  |  |  | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| определение количества лейкоцитов |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| определение количества эритроцитов |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| приготовление мазка крови |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| окрашивание мазков крови |  |  |  |  |  | 3 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| подсчёт лейкоцитарной формулы |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| подсчет ретикулоцитов в мазке кровь |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  супровитальная окраска ретикулоцитов |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| определение гематокрита  |  |  |  |  |  |  |  | 2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| определение длительности кровотечения  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| определение время свёртывания крови |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| определение количества тромбоцитов |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| определение осмотической стойкости эритроцитов |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |  |  |  |
| Определение групп крови  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 3 |  |  |  |  |
| Определение резус принадлежности крови |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  |
| определение гематологических показателей на гематологическом анализаторе |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1 |  |  |  |  |  |

**Инструктаж по технике безопасности**

**Инструктаж по технике безопасности при работе с биоматериалом:**

1. В лаборатории проводить работы только в спецодежде: медицинском халате, сменной обуви, колпаке, резиновых перчатках. При угрозе разбрызгивания биологических жидкостей также надевают медицинскую маску, защитные очки или экран, клеенчатый фартук.

2. Надевать резиновые перчатки при любом соприкосновении с биологическими жидкостями.

3. Повреждения на коже рук дополнительно под перчатками закрываются напальчником или лейкопластырем.

4. Резиновые перчатки надевать поверх медицинского халата.

5. После каждого снятия перчаток необходимо тщательно мыть руки.

6. Не допускается пипетирования жидкостей ртом, для этого используются резиновые груши или автоматические пипетки.

7. Исключаются из обращения пробирки с битыми краями.

8. Перед началом работы проводится проверка исправности аппаратуры, используемой в КДЛ.

9. Поверхности столов в конце рабочего дня обеззараживают протиранием дезсредством, при загрязнении стола биологическими жидкостями – немедленно двукратно с интервалом в 15 минут протереть поверхность дезсредством.

10. После исследования вся посуда, соприкасающаяся с биологическим материалом, перчатки, должны подвергаться обеззараживанию – дезинфекции, которая проводится путем погружения на 1 час в дезраствор.

**При возникновении аварийной ситуации:**

1. При попадании биологической жидкости на незащищенную кожу – немедленно обработать кожу 70% этиловым спиртом, вымыть руки дважды с мылом, повторно обработать 70% этиловым спиртом.

2. При попадании биологической жидкости в глаза – обильно промыть водой (не тереть).

3. При попадании биологической жидкости в рот – прополоскать водой, а затем 70% этиловым спиртом.

4. При получении травмы (укол, порез, ссадина) во время работы с биологической жидкостью, если из раны течет кровь – не останавливать, если кровотечения нет – выдавить несколько капель крови, затем обработать рану 70% этиловым спиртом, промыть под проточной водой с мылом дважды, края раны обработать йодом, заклеить пластырем (или клеем БФ) или сделать повязку.

5. При попадании биологической жидкости в нос – обильно промыть водой (не тереть).

6. При загрязнении биологической жидкостью халата и одежды – снять рабочую одежду и погрузить в дезинфицирующий раствор или бикс (бак) для автоклавирования.

**Правила безопасной работы с биологическим материалом регламентируются:**

1. Приказом №408 МЗ СССР от 12.07.1989г. «О мерах по снижению заболеваемости вирусным гепатитом»

2. Приказом №170 МЗ РФ от 15.08.1994г. «О мерах по совершенствованию профилактики и лечения ВИЧ-инфекции в РФ»

3. Инструкцией по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в КДЛ ЛПУ.

4. СанПин 2.1.3.2630-10 от 09.08.2010г. «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность»

5. СанПиН 2.1.7.2790-10 от 09.12.2010г. «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»

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

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

М.П.

**1 день производственной практики, 26.03.2020 г.**

Перед началом работы был проведен вводный инструктаж и первичный инструктаж на рабочем месте, ознакомление с нормативными документами, регламентирующими работу в клинико-диагностической лаборатории.

Проведено закрепление правил забора капиллярной крови.

При работе с кровью необходимо руководствоваться документами:

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. ОСТ 42-21-2-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения».

Так как с кровью могут передаваться ВИЧ и вирусные гепатиты, медицинские работники должны относиться к крови и другим биологическим жидкостям как к потенциально зараженным и соблюдать следующие правила при работе с ними:

- надевать резиновые перчатки при любом соприкосновении с кровью и другими биологическими жидкостями

- повреждения на коже рук дополнительно под перчатками закрывать напальчниками или лейкопластырем

- резиновые перчатки надевать поверх рукавов медицинского халата

- после каждого снятия перчаток

- тщательно мыть руки-не допускатьнасасывания крови или сыворотки ртом! Пользоваться для этого резиновыми грушами или автоматическими пипетками

- исключить из обращения пробирки с битыми краями

- поверхности столов в конце рабочего дня обеззараживать протиранием 3% раствором хлорамина или другим дезсредством. В случае загрязнения кровью – немедленно двукратно с интервалом в 15 минут протереть дезраствором

- При попадании крови на незащищенную кожу – немедленно обработать кожу 70% спиртом, вымыть руки дважды с мылом под проточной водой, повторно обработать 70% спиртом

- При попадании крови в глаза – промыть струей воды и закапать 1% раствор борной кислоты или промыть 0,05% раствором марганцево-кислого калия

- При попадании крови в рот – прополоскать водой, а затем 1% раствором борной кислоты или 0,05%о раствором марганцево-кислого калия или 70%> спиртом

- При загрязнении кровью перчаток их протирают 3% хлорамином или 6% перекисью водорода

- Не принимать пищу, не курить, не пользоваться косметикой на рабочем месте,

Кровь для проведения общего клинического анализа обычно берут из пальца, а у новорожденных – из пятки. Взятие крови рекомендуется проводить утром натощак или после легкого завтрака, до физической нагрузки, лечебных и диагностических процедур.

Взятие крови из пальца проводится за столом, покрытым стеклом или пластиком. На рабочем месте лаборанта должно быть удобно расположено все необходимое для забора крови:

- 70% спирт

- стерильные ватные шарики

- стерильные капилляры Панченкова, капилляры Сали, резиновые груши

- стерильные (лучше одноразовые) скарификаторы

- предметные и шлифованные стекла

- штатив с пробирками, в которые предварительно разлиты реактивы для определения гемоглобина, количества эритроцитов, лейкоцитов, СОЭ

- штатив Панченкова

- емкости с дезинфицирующим раствором для сброса использованных скарификаторов, капилляров, ватных шариков, предметных стекол и т.д.

Обычно кровь берут из 4 пальца левой руки. Если это невозможно – из любого другого пальца или мочки уха. Участок кожи, предназначенный для взятия крови, дезинфицируют и обезжиривают 70% спиртом. После обработки спиртом кожа должна высохнуть, иначе кровь будет растекаться. Левой рукой лаборант сдавливает мякоть 4 пальца обследуемого. Иглу-скарификатор следует ставить строго перпендикулярно месту прокола, чтобы разрез пришелся поперек кожных линий. Это способствует большему зиянию ранки и более длительному кровотечению. Укол лучше проводить сбоку от средней линии, где более густая капиллярная сеть. Не следует делать прокол у самого ногтя, так как кровь тогда будет затекать под ноготь. Делают укол скарификатором до упора. Первую выступившую каплю крови, содержащую примесь тканевой жидкости, для анализа не используют, а удаляют сухим ватным шариком.

**Способы взятия крови**

После прокола кожи несколько капель (не менее 3-4) спускают на предметное стекло, перемешивают и используют для работы.

Кровь с поверхности пальца после приготовления мазков набирается индивидуальным стерильным капилляром и вносится в 5% цитрат натрия, для определения СОЭ,1/4 капилляра – на предметное стекло для определения количества гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов).

Капилляром Панченкова набирают 5% цитрат натрия до метки «Р» (50 делений) в пробирку. Этим же капилляром берут два капилляра крови до метки «К» и вносят в пробирку с цитратом. Хорошо перемешивают. Этим же капилляром набирают цитратную кровь для определения СОЭ. Оставшуюся в пробирке кровь используют для исследования количества гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов. Поправка на разведение крови цитратом (4:1) вносится умножением полученных результатов на 1,25.

Мазки крови для подсчета лейкоформулы делают из цельной крови, выступающей после снятия первой капли.

После прокола кожи пальца 6-8 капель крови спускают в пластиковую пробирку с небольшим количеством трилона Б либо в специальные пластиковые пробирки одноразового пользования, обработанные ЭДТА.

На одного пациента при заборе крови из пальца расходуется 5 стерильных ватных шариков:

1. ватный шарик со спиртом для протирания перчаток лаборанта

2. ватный шарик со спиртом для протирания кожи пациента

3. сухой ватный шарик для снятия первой капли крови

4. ватный шарик со спиртом для прикладывания к ранке после окончания забора крови

5. ватный шарик со спиртом для протирания перчаток лаборанта после взятия крови.

**2 день производственной практики, 27.03.2020 г.**

Изучение методов определения гемоглобина.

**Определение содержания гемоглобина крови унифицированным гемиглобинцианидным методом**

Принцип: гемоглобин при взаимодействии с железосинеродистым калием (красной кровяной солью) окисляется в метгемоглобин (гемиглобин), образующий с ацетонциангидрином соединение красного цвета –гемиглобинцианид, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию гемоглобина.

Реактивы:

* Трансформирующий раствор (ацетонциангидрин – 0,5 мг; калий железосинеродистый – 0,2 г; натрия гидрокарбонат – 1,0 г; дистиллированная вода – до 1 л.

Раствор стабилен при комнатной температуре в течение нескольких месяцев при хранении в посуде из темного стекла. При обесцвечивании и появлении осадка непригоден.

* Калибровочный раствор гемиглобинцианида – для построения калибровочного графика (при использовании ФЭКа).

В настоящее время для определения гемоглобина крови в большинстве клинико-диагностических лабораторий пользуются готовыми наборами реактивов, выпускаемыми рядом фирм.

Специальное оборудование: ФЭК или МИНИГЕМ-540.

Ход определения:

1. В пробирку с помощью градуированной пипетки или автоматического дозатора наливают точно 5 мл трансформирующего раствора.
2. В трансформирующий раствор вносят 0,02 мл (капилляр Сали) крови.
3. Промывают капилляр 2-3 раза трансформирующим раствором.
4. Тщательно перемешивают содержимое пробирки. При этом получается разведение крови в 251 раз.
5. Оставляют стоять на 20 минут.
6. Колориметрируют на МИНИГЕМе-540 или на ФЭКе при условиях: светофильтр зеленый (длина волны 520-560 нм), кювета 10 мм, против трансформирующего раствора.

При использовании ФЭКа содержание гемоглобина определяют по калибровочному графику.

**Определение содержания гемоглобина в крови гемихромным методом**

Принцип: гемоглобин крови под действием поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия переходит в низкоспиновую окисленную форму – гемихром, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации гемоглобина в крови измеряется фотометрически при длине волны 540 (500-560 нм).

Чувствительность – не более 10 г/л

Реактивы:

* Трансформирующий реагент.
* Калибровочный раствор гемоглобина с концентрацией 120 г/л.

Ход определения:

1. В пробирки внести по 5,0 мл трансформирующего раствора.
2. Добавить по 0,02 мл крови (разведение в 251 раз), тщательно перемешать.
3. Инкубировать при комнатной температуре (+18-25оС) в течение 20 мин.
4. Измерить величину оптической плотности опытных проб против холостой пробы (трансформирующего раствора) при длине волны 540 (500-560 нм) в кювете на 10 мм.

Окраска устойчива в течение часа.

Концентрацию гемоглобина рассчитать по формуле:

$С=\frac{Е\_{о}}{Е\_{к}}×120$

Где С – концентрация гемоглобина в опытной пробе, г/л; Ео – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн; Ек – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.; 120 – концентрация гемоглобина в калибровочном растворе, г/л.

**Определение содержания гемоглобина в крови методом Сали**

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

Реактивы:

* 0,1N раствор соляной кислоты
* дистиллированная вода

Оборудование: гемометр Сали, глазная пипетка, стеклянная палочка.

Ход определения:

1. В градуированную пробирку гемометра Сали наливают 0,1N раствор соляной кислоты до нижней круговой метки.
2. Капилляром Сали набирают кровь чуть больше метки (0,02 мл). Вытирают кончик капилляра сухим ватным шариком, одновременно доводя уровень крови точно до метки.
3. Опускают кончик капилляра на дно градуированной пробирки гемометра Сали с раствором соляной кислоты. Осторожно, без пузырей выдувают кровь в раствор. Приподняв немного капилляр, промывают его 2-3 раза прозрачным раствором соляной кислоты.
4. Извлекают капилляр из пробирки, предварительно выдув на ее стенку остаток жидкости.
5. Встряхивают смесь крови с соляной кислотой и оставляют стоять точно на 5 минут.
6. Через 5 минут в градуированную пробирку вносят глазной пипеткой воду, каждый раз тщательно перемешивая жидкость стеклянной палочкой. Разведение продолжают до полного совпадения цвета жидкости в градуированной пробирке со стандартным раствором.
7. Снимают показания, держа пробирку на уровне глаз. Стеклянная палочка при этом должна быть вытащена. Полученная цифра указывает концентрацию гемоглобина в процентах. Чтобы выразить его содержание в единицах СИ, то есть в г/л, нужно количество гемоглобина в процентах умножить на 10.

Источники ошибок при определении гемоглобина по Сали

1. Главная ошибка метода – гематиновая, зависит от характера и количества белков крови, которые могут искажать цвет солянокислогогематина. Гематиновая ошибка не зависит от работы лаборанта.
2. Неточное соблюдение 5-ти минутной экспозиции
3. Выцветание стандартных растворов (на свету). Гемометр следует хранить в темном мечте в закрытой коробке.
4. Неточное приготовление 0,1N раствора соляной кислоты
5. Использование старых гемометров. Разрешается пользоваться только ГС-3 и ГС-4.

Суммарная ошибка метода Сали может достигать 30%, поэтому этот метод не является унифицированным. Им можно пользоваться только в качестве ориентировочно.

**3 день производственной практики, 28.03.2020 г.**

Методический день: начало работы над дневником.

**4 день производственной практики, 30.03.2020 г.**

Изучение методов определения СОЭ.

**Определение СОЭ унифицированным микрометодом Панченкова**

Принцип: смесь крови с цитратом при стоянии разделяется на два слоя: нижний – эритроциты, верхний – плазма.

Реактивы:

* 5% раствор цитрата натрия (натрия лимоннокислоготрехзамещенного)

Специальное оборудование: штатив Панченкова, капилляры Панченкова

Ход определения:

1. Капилляр Панченкова промывают раствором цитрата натрия и набирают цитрат в капилляр до метки 75 (1/4 часть капилляра Панченкова, 19 или 25 делений капилляра). Выдувают цитрат натрия в агглютинационную пробирку или в лунку предметного стекла.
2. Прокалывают палец и набирают кровь в тот же капилляр Панченкова без пузырьков воздуха до метки «0» («К»). Выдувают кровь в пробирку или лунку предметного стекла с цитратом.
3. Перемешивают кровь с цитратом. При этом получается соотношение крови и цитрата 4:1.
4. Набирают смесь крови с цитратом в тот же капилляр Панченкова до метки «0» без пузырьков воздуха и ставят в штатив Панченкова строго вертикально на 1 час.
5. Точно через1 час отмечают скорость оседания эритроцитов по высоте отстоявшегося слоя плазмы в миллиметрах.

Источники ошибок при определении СОЭ:

1. Несоблюдение соотношения крови с цитратом
2. Недостаточное перемешивание крови и цитрата, вследствие чего кровь может свернуться
3. Косое положение капилляра
4. Температурные условия: при температуре выше 22°С СОЭ увеличивается, при температуре ниже 16°С – замедляется.

**Определение СОЭ методом Вестергрена**

Этапы:

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. Вместе с тем, необходимо понимать, что классический метод Вестергрена имеет целый ряд модификаций, сущность которых состоит в уменьшении длины капилляра (например, используются моноветты или вакуумные пробирки с раствором натрия цитрата рабочая длина которых составляет 120 мм, а не 200 мм, как в классическом методе Вестергрена), изменении угла установки капилляра (например, ряд фирм использует установку вакуумных пробирок под углом 18°), укорочении времени для наблюдения за оседанием эритроцитов (до 30–18 мин) или сочетании этих изменений. Насколько такие модификации можно называть методом Вестергрена в научной литературе не решен.

**5 день производственной практики, 31.03.2020 г.**

Изучение методов подсчета количества лейкоцитов и эритроцитов в камере Горяева.

Исследование лейкоцитов – одно из самых распространенных в лабораторной практике. Подсчет количества лейкоцитов входит в общий анализ крови, проводится всем стационарным и амбулаторным больным и при диспансеризации.

**Унифицированный метод подсчета количества лейкоцитов крови в счетной камере**

Принцип: подсчитывают лейкоциты под микроскопом в определенном объеме счетной камеры при постоянном разведении крови после разрушения эритроцитов.

Реактивы:

* 3-5% раствор уксусной кислоты, подкрашенный несколькими каплями раствора метиленового синего для окраски ядер лейкоцитов.

Раствор голубого цвета, длительно годен к употреблению.

Специальное оборудование: микроскоп, счетная камера Горяева.

Ход определения:

1. В агглютинационную пробирку с 0,4мл 3-5% раствора уксусной кислоты вносят 0,02мл (капилляр Сали) крови, 2-3 раза промывают капилляр раствором кислоты. Перемешивают содержимое пробирки. При этом получается разведение крови в 20 раз.
2. Оставляют до момента счета, но не более 2-4 часов после взятия крови.
3. Подготавливают и заполняют смесью крови с уксусной кислотой камеру Горяева, предварительно тщательно еще раз перемешав ее.
4. Оставляют заполненную счетную камеру в горизонтальном положении на 1-2 минуты для оседании лейкоцитов.
5. Подсчитывают лейкоциты в 100 больших (не разделенных на малые квадраты и полосы) квадратах камеры Горяева при условиях: 25-увеличение малое (объектив 8Х), окуляр 10Х или 15Х, конденсор опущен.



Расчет

При расчете количества лейкоцитов в 1мкл крови используют формулу

$$Х=\frac{а×4000×20}{1600}$$

 Где X – количество лейкоцитов в 1 мкл крови; а – количество лейкоцитов, подсчитанное в 100 больших квадратах; 4000 – коэффициент перевода объема на 1мкл, исходя из объёма малого квадрата, который составляет $\frac{1}{4000} $мкл; 1600 – количество сосчитанных малых квадратов; 20 – разведение крови.

Для перевода количества лейкоцитов в единицы СИ (в 1 л крови) полученную цифру умножают на 106.

Практически для определения содержания лейкоцитов в 1 л крови количество лейкоцитов, подсчитанное в 100 больших квадратах счетной камеры, умножают на 50, делят на 1000 (то есть переносят запятую на 3 знака влево) и умножают на 109/л.

Эритроциты – самый многочисленный вид форменных элементов крови. Основным компонентом красных кровяных телец является гемоглобин, который составляет 95% сухого вещества эритроцитов

**Факторы преаналитического этапа, влияющие на количество эритроцитов в крови**

Количество эритроцитов в крови снижается при положении обследуемого лежа, после еды (на 10%), при беременности, в пожилом возрасте, при употреблении в пищу бобовых, алкоголя, лечении антибиотиками, сульфаниламидами, анальгетиками.

Физиологическое повышение количества эритроцитов в крови отмечается у женщин после 60 лет (на 8-9%), с 7.00 до 17.00 (на 5%), у курящих.

**Унифицированный метод подсчета количества эритроцитов крови в счетной камере**

Принцип: подсчитывают эритроциты под микроскопом в определенном объеме счетной камеры при постоянном разведении крови.

Реактивы:

* 0,9% раствор хлорида натрия (физиологический раствор).

Специальное оборудование: микроскоп, счетная камера Горяева.

Ход определения:

1. В чистую сухую пробирку с помощью мерной пипетки или автоматического дозатора наливают точно 4мл физиологического раствора.
2. Вносят 0,02мл (капилляр Сали) крови в физраствор, промывают им капилляр 2-3 раза.
3. Перемешивают содержимое пробирки. При этом получается разведение крови в 200 раз.
4. Оставляют до момента счета, но не более 2-3 часов. При подозрении на анемию подсчет проводят тотчас же после взятия крови, так как эритроциты при некоторых видах анемий быстро разрушаются.
5. Подготавливают к работе камеру Горяева.
6. Ещё раз тщательно перемешивают содержимое пробирки и заполняют этой смесью камеру Горяева с помощью пастеровской пипетки или стеклянной палочки с оплавленным концом.
7. Оставляют заполненную счетную камеру на 1 минуту в горизонтальном положении для оседания эритроцитов.
8. Подсчитывают эритроциты в 5 больших квадратах, разграфленных каждый на 16 малых квадратов и расположенных по диагонали сетки Горяева (см. рис. 3). Таким образом, считают эритроциты в 80 малых квадратах. Счет начинают с левого верхнего угла сетки и ведут при условиях: конденсор опущен, окуляр 10х или 15х, объектив 8х.

При подсчете эритроцитов руководствуются теми же правилами, что и при подсчете лейкоцитов, то есть считают все клетки, находящиеся внутри квадрата и на разграничительных линиях, если они большей частью заходят внутрь квадрата. Клетки же, пересеченные разграничительной линией точно пополам, подсчитывают лишь на двух сторонах квадрата (например, левой и верхней).



Расчет

Количество эритроцитов в 1 мкл крови рассчитывают по формуле

$$Х=\frac{а×4000×200}{80}=а×1000$$

Где X – количество эритроцитов в 1мкл крови; а – количество эритроцитов, подсчитанных в 80 малых квадратах; 4000 – коэффициент перевода объема на 1 мкл (объём одного малого квадрата равен $\frac{1}{4000} $мкл); 200 – разведение крови; 80 – количество сосчитанных малых квадратов.

Чтобы перевести содержание эритроцитов в единицы СИ (1 л крови), следует количество эритроцитов в миллионах умножить на 1012/л. Практически для определения содержания эритроцитов в 1 л крови необходимо количество эритроцитов, подсчитанное в 5 больших квадратах, разделить на 100 (то есть перенести запятую на 2 знака влево) и умножить на 1012/л.

Подсчет эритроцитов в счетной камере является трудоемким и недостаточно точным методом. На результатах подсчета сказываются малейшая неточность при взятии крови в капилляр, недостаточное перемешивание крови с физраствором, любое отклонение от правил подготовки счетной камеры, её заполнения и подсчета клеток, а также недоброкачественность физраствора и мокрая или грязная посуда (пробирки, пипетки, капилляры).

**6 день производственной практики, 01.04.2020 г.**

Изучена техника приготовления и окрашивания мазков крови, а также техника подсчета лейкоцитарной формулы.

Мазки крови готовят на предметных стеклах, которые предварительно моют и обезжиривают.

**Подготовка предметных стекол**

Стекла (новые и бывшие в употреблении) замачивают на 8-10 часов в 2% растворе хозяйственного мыла или СМС в эмалированной посуде. Кипятят в этом же растворе 5-10 минут. Более длительное кипячение и использование алюминиевой посуды не рекомендуется, так как приводит к помутнению стекол. Промывают в проточной воде. Насухо вытирают. Помещают для обезжиривания на 30-60 минут в смесь Никифорова (спирт 96% и диэтиловый эфир в соотношении 1:1). Насухо вытирают чистой тканью и хранят в закрытой чистой посуде.

**Техника приготовления мазков**

Мазок крови делается с помощью шлифованного стекла с идеально ровным краем, ширина которого должна быть на 2-3 мм меньше, чем у предметного стекла.

1. После прокола пальца первую каплю удаляют сухим ватным тампоном. К куполу следующей капли прикасаются предметным стеклом на расстоянии 1,5-2см от края стекла. **К коже в месте прокола не прикасаться!**
2. Капля крови на предметном стекле должна иметь диаметр 2-3 мм.
3. Шлифованное стекло ставят под углом 45º на 1-2 мм перед каплей и двигают его назад к капле так, чтобы вся кровь растеклась по краю шлифованного стекла.
4. Быстрым легким движением делают мазок, пока не кончится вся капля крови.
5. Высушивают мазки на воздухе.
6. Маркируют их простым карандашом, обозначая на толстой части мазка фамилию и инициалы пациента или его регистрационный номер.

Делают не менее двух мазков.

**Требования к мазку**

Правильно приготовленный мазок должен быть:

* равномерной толщины, полупрозрачным, желтоватого цвета;
* достаточной величины – занимать ½ - ¾ длины предметного стекла, отступив от края на 1-1,5 см;
* оканчиваться «метелочкой».

Толстые мазки для исследования не пригодны, так как клетки в них располагаются в несколько слоев и деформируются. В правильно приготовленных тонких мазках клетки располагаются в один слой.

Готовые высушенные мазки крови фиксируют, а затем окрашивают. В неокрашенном виде мазки сохраняются при комнатной температуре в течение 3 дней.

**Фиксация мазков крови**

Фиксация мазков предохраняет элементы крови от воздействия содержащейся в красках воды, под влиянием которой в нефиксированных мазках происходит разрушение эритроцитов и изменяется морфология лейкоцитов. Фиксация также вызывает коагуляцию белков и закрепляет мазок на стекле.

Для фиксации используют следующие реактивы:

* Метиловый спирт –время фиксации 3-5 минут;
* Раствор эозинметиленового синего по Май-Грюнвальду (фиксация 3 минуты);
* Этиловый спирт (фиксация 20-25 минут);
* Смесь Никифорова (фиксация 30 минут).

Фиксацию проводят либо в специальной кювете, либо в широкогорлой банке с хорошо закрывающейся крышкой. Фиксированные мазки высушивают на воздухе и окрашивают.

**Окраска мазков крови**

Проводится в специальных кюветах или на «мостике».

В качестве унифицированных приняты 3 метода окраски мазков крови:

* по Романовскому-Гимзе
* по Нохту
* по Паппенгейму

Принцип:

Основу современных методов окраски клеток крови заложил петербургский врач Д.Л. Романовский, который в конце 19 века предложил окрашивать препараты одновременно двумя красителями –щелочной и кислой реакции. И по настоящее время все используемые методы окраски клеток крови имеют единый принцип: использование щелочного и кислого красителей. Различные клеточные структуры имеют разную рН и связываются с красителем противоположной реакции. Ядра клеток богаты нуклеиновыми кислотами, имеют кислую реакцию и окрашиваются красителями щелочной реакции (метиленовым синим, азуром I и II) в сине-фиолетовый цвет. Цитоплазма гранулоцитов, зернистость эозинофилов, эритроциты содержат щелочные белки, поэтому окрашиваются красителем кислой реакции (эозином) в розовый цвет.

**Окраска по Романовскому–Гимзе**

Реактивы:

* Готовая краска Романовского

В её состав входит азур-II (смесь равных частей азура-I и метиленового синего) и эозин.

Заводская краска очень концентрированная и перед употреблением её нужно разводить. Степень разведения и время окраски определяется опытным путем и называется **титрование краски Романовского.**

От правильно подобранного титра краски зависит качество окраски мазков и соответственно точность подсчёта лейкоцитарной формулы, которая отражает состояние пациента.

Готовят три разведения краски из расчета:

* 1 капля красителя на 1 мл дистиллированной воды;
* 2 капли красителя на 1 мл дистиллированной воды;
* 3 капли красителя на 1 мл дистиллированной воды.

Каждым из разведений окрашивают 5 зафиксированных мазков в течение 20, 25, 30, 35 и 40 минут. На каждом мазке отмечают время окраски и разведение красителя.

После окрашивания микроскопируют мазки и определяют разведение и время, при которых получена наилучшая окраска.

Эти условия, соответствующие лучшему окрашиванию, указывают на этикетке бутыли с краской. Например: титр краски – 1капля/мл; экспозиция –30 минут. Титрование краски Романовского проводят один раз перед использованием каждой новой партии красителя.

Ход окраски:

1. 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.
2. Красят мазки в соответствии с выбранной экспозицией.
3. Промывают мазки проточной водой и высушивают на воздухе.

**Окраска по Нохту**

Реактивы:

* Основной раствор азура II (1г на 1л дистиллированной воды)
* Основной раствор эозина К (1г на 1л дистиллированной воды)

Красители нуждаются в вызревании в течение 2 недель в темном месте при периодическом помешивании.

* Фосфатный буфер с рН 7,4-7,5
* Рабочий раствор азур-эозина готовят перед употреблением путем смешивания: 4925 мл основного раствора азура II; 20 мл основного раствора эозина К; 55 мл буферного раствора.

Ход окраски

1. Окраску производят так же, как методом Романовского – в кюветах с помощью свежеприготовленного рабочего раствора азур-эозина в течение 20-45 минут.
2. Пропорции красителей и время окраски устанавливаются опытным путем для каждой партии красителя.

**Окраска по Паппенгейму**

Реактивы:

* Готовый краситель-фиксатор Май-Грюнвальда (растворяют 1г эозинметиленового синего в 1л метилового спирта)
* Свежеприготовленный раствор краски Романовского или рабочий раствор азур-эозина по Нохту.

Ход окраски:

Мазки не нуждаются в предварительной фиксации, так как краска Май-Грюнвальда, приготовленная на метиловом спирте, одновременно и фиксирует, и красит мазок.

1. На нефиксированный мазок наносят 2 мл красителя-фиксатора Май-Грюнвальда на 3 минуты.
2. Доливают столько же (2 мл) дистиллированной воды и выдерживают 1 минуту.
3. Краску сливают, промывают мазки водопроводной водой.
4. Окрашивают 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.
5. 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.

В настоящее время подсчёт лейкоцитарной формулы проводится в каждом общем анализе крови.

Морфология клеток крови описывается по определенной схеме:

1. Размер и форма клетки.
2. Ядерно-цитоплазматическое соотношение.
3. Характеристика ядра: его размер, форма, расположение в клетке (центральное, эксцентричное), цвет, структура, наличие ядрышек и вакуолей.
4. Характеристика цитоплазмы: ширина, цвет, наличие специфической зернистости (цвет зерен, их количество и размер), наличие неспецифической азурофильной зернистости, вакуолей, фагоцитированных элементов, перинуклеарной зоны.

**Факторы преаналитического этапа, влияющие на лейкоцитарную формулу крови**

Лечение гормонами надпочечников и АКТГ способствует увеличению количества эозинофилов.

Прием эстрогенных гормонов и препаратов для лечения тиреотоксикоза вызывает повышение количества базофилов. Повышение нейтрофилов возникает после еды, при переохлаждении, укусе насекомых, приеме гепарина, гистамина и др. лекарственных препаратов.

Прием наркотических анальгетиков сопровождается увеличением относительного содержания лимфоцитов и моноцитов в периферической крови.

**Техника подсчета 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 какие-либо 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.

**Приготовление лейкоконцентрата**

Приготовление лейкоконцентрата проводят в случаях выраженной лейкопении, когда подсчет лейкоформулы затруднен, а также для обнаружения патологических элементов, не выявляемых в обычных препаратах (бластных клеток при лейкопенических формах лейкозов и т.п.).

Принцип: в связи с разным удельным весом эритроцитов и лейкоцитов и добавлением трилона Б, ускоряющего осаждение эритроцитов, получают плазму, содержащую большое количество лейкоцитов.

Реактивы:

* 3% раствор трилона Б.

Ход определения:

1. В пробирку с 1мл 3% раствора трилона Б вносят 4мл венозной крови.
2. Осторожно перемешивают.
3. Оставляют стоять 30-45 минут при комнатной температуре или в термостате при 37ºС. При этом образуется 2-3 мл прозрачной плазмы.
4. Пастеровской пипеткой отсасывают надосадочную жидкость в центрифужную пробирку, стараясь не захватывать эритроциты.
5. Центрифугируют 10 минут при 1000 об/мин.
6. Надосадочную жидкость удаляют пипеткой, а из осадка готовят мазки крови, помещая 1 каплю осадка на предметное стекло.
7. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают гематологическими красителя

**Оценка выраженности изменения морфологии лейкоцитов**

Наличие дегенеративных признаков изменения морфологии лейкоцитов обязательно фиксируется в результате анализа. Выраженность тех или иных изменений морфологии лейкоцитов оценивают в процентах или обозначают цифрами от 1 до 4. Если какой-то вид изменений, например, токсическая зернистость, при подсчете лейкоцитарной формулы имеется во всех встретившихся нейтрофилах, то в бланке результата исследования указывается «Токсическая зернистость 100% (4)». При меньшей выраженности патологических изменений морфологии она может оцениваться как: токсическая зернистость 75% (3); токсическая зернистость 50% (2); токсическая зернистость 25% (1).

**Артефакт** – это процесс или образование, не свойственное изучаемому объекту и возникающее в ходе его исследования под воздействием самих условий исследования. К артефактам при исследовании морфологии клеток крови относятся:

* преципитация (выпадение в осадок) краски, которая под микроскопом имеет вид темно-синих гранул или нитей, расположенных между клетками и на них, мешая исследованию;
* водный артефакт может наблюдаться при медленном высыхании мазка в условиях высокой влажности воздуха. В эритроцитах в этом случае появляются зоны, резко преломляющие свет;
* при использовании в качестве антикоагулянта ЭДТА может наблюдаться сателлизм тромбоцитов, когда 4 и более тромбоцита окружают нейтрофил.

**7 день производственной практики, 02.04.2020 г.**

Изучение методов суправитальной окраски ретикулоцитов и их подсчет в окрашенном мазке.

**Факторы преаналитического этапа, влияющие на количество ретикулоцитов**

Повышенный уровень глюкозы крови может привести к ложно заниженным результатам уровня ретикулоцитов.

Накануне исследования не рекомендуется прием антибиотиков, сульфаниламидов, анальгетиков.

Подсчет количества ретикулоцитов в окрашенном мазке крови следует проводить не позднее, чем через 1-2 часа после его приготовления.

**Унифицированный метод подсчета количества ретикулоцитов**

Принцип: суправитальная (прижизненная) окраска красителями, выявляющими зернисто-нитчатую субстанцию.

Реактивы: можно использовать один из следующих реактивов:

* Насыщенный раствор бриллиантового крезилового синего в абсолютном спирте
* Раствор азура I - 1%
* Раствор азура II - 2%

Окраска ретикулоцитов может проводиться как на предметном стекле, так и в пробирке.

**Окраска на стекле**

1. Хорошо вымытые и обезжиренные стекла слегка подогревают над спиртовкой.
2. 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.
3. На мазок краски наносят 1 каплю крови и готовят из нее тонкий мазок.
4. Тотчас же, не давая высохнуть крови, помещают мазок во влажную камеру (чашку Петри с уложенной по бортикам фильтровальной бумагой) на 3-4 минуты.
5. Высушивают на воздухе и микроскопируют.

**Окраска в пробирке**

Метод 1

1. В пробирку помещают: 4 капли краски 1 + 1 каплю 1% оксалата калия
2. Вносят туда 2 капилляра Сали (0,04мл) крови
3. закрывают влажной ваткой, перемешивают и оставляют на 30 минут
4. Снова перемешивают и готовят тонкие мазки.

Метод 2

1. В пробирку помещают 0,05 мл краски 3 и 0,2 мл крови
2. Смесь закрывают влажной ваткой, тщательно перемешивают и оставляют на 20-30 минут
3. Перемешивают и готовят тонкие мазки.

Метод 3

1. В пробирку помещают 0,3-0,5 мл краски 2 и 5-6 капель крови капилляром Панченкова
2. Закрывают пробирку резиновой пробкой, тщательно перемешивают и оставляют на 1-1,5 часа
3. 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, зернисто-нитчатая 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.

**8 день производственной практики, 03.04.2020 г.**

Изучение техники определения гематокрита.

**Факторы преаналитического этапа, влияющие на гематокритную величину**

Показатель гематокрита снижается при положении больного лежа (на 5,7%), после еды (на 10%), а также в промежутке между 07.00 и 17.00.

Расчетная величина гематокрита, определяемая на гематологических автоматах, ниже на 2%, чем определяемая методом центрифугирования.

Нельзя использовать в качестве антикоагулянта оксалат натрия, так как его применение значительно занижает результаты по сравнению с гепаринизированной кровью.

**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.

Реактивы: один из антикоагулянтов:

* Раствор гепарина 1000 ЕД/мл (готовый раствор содержит 5000 ЕД/мл, его разводят 1:5)
* Раствор трилона Б (ЭДТА) –4%.

Ход определения:

1. 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.
2. Центрифугируют 5 минут при 8000 об/мин.
3. По специальной шкале, приложенной к центрифуге, определяют гематокритную величину.

Гематокрит также можно определить:

* 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%

Клиническое значение

Снижение гематокритной величины характерно для анемии. Этот показатель широко используется в практической медицине для оценки степени анемии: чем ниже гематокрит, тем тяжелее анемия. Повышение гематокритной величины наблюдается при эритроцитозах.

**9 день производственной практики, 04.04.2020 г.**

Методический день: заполнение дневника.

**10 день производственной практики, 06.04.2020 г.**

Изучение техники определения длительности кровотечения и времени свертывания крови.

Исследование длительности кровотечения, время свёртывания и количества тромбоцитов часто используются в клинической практике при подозрениях на геморрагические диатезы.

**Факторы преаналитического этапа, влияющие на показатели свертывания крови**

Увеличению времени кровотечения способствует прием некоторых лекарственных препаратов (ацетилсалициловой кислоты, нестероидных противовоспалительных средств, пенициллина и др.). Антикоагулянты (гепарин и др.) увеличивают время свертывания крови, пероральные контрацептивы – снижают его.

**Определение длительности кровотечения по Дуке**

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

Ход проведения:

1. Определение может проводиться при проколе пальца или мочки уха. Глубина прокола должна быть не менее 3мм –только при этом условии кровь из ранки выделяется самопроизвольно, без нажима.
2. Сразу после прокола включают секундомер.
3. 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.
4. Когда следы крови перестанут оставаться, секундомер выключают.

Источники ошибок:

1. Недостаточно глубокий прокол;
2. Поспешное снятие капель крови;
3. Прикосновение фильтровальной бумагой к коже, что способствует остановке кровотечения.

Нормальные величины

Длительность кровотечения по Дуке составляет 2-4 минуты.

Диагностическое значение

Практическое значение имеет удлинение времени кровотечения, что наблюдается при тромбоцитопениях, заболеваниях печени, гиповитаминозе С, злокачественных опухолях и др. При гемофилии этот тест остается в пределах нормы.

**Определение времени свертывания капиллярной крови по Сухареву**

Принцип: определяется время образования сгустка крови в капилляре Панченкова.

Ход работы:

1. Прокалывают кожу, удаляют первую каплю крови.
2. Набирают самотеком кровь в чистый сухой капилляр Панченкова до метки «70-75» (25-30 делений) без пузырьков воздуха.
3. Включают секундомер.
4. 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.
5. 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.
6. При полном свертывании кровь перестает двигаться.
7. Моменты начала и конца свертывания крови засекают по секундомеру.

Нормальные величины

Начало свертывания – 30 секунд – 2 минуты; конец свертывания – 3-5 минут.

Диагностическое значение

Удлинение времени свертывания крови наблюдается при тяжелой недостаточности факторов, участвующих во внутреннем пути образования протромбиназы, дефиците протромбина и фибриногена, а также при передозировке гепарина.

**11 день производственной практики, 07.04.2020 г.**

Изучение техники подсчета тромбоцитов.

**Факторы преаналитического этапа, влияющие на количество тромбоцитов в крови**

Снижение количества тромбоцитов в крови отмечается при беременности, менструации, приеме алкоголя и некоторых лекарственных препаратов (нитроглицерин, преднизолон, эстрогены). Вследствие оседания и прилипания тромбоцитов к пробирке возможно снижение их истинного числа. Для устранения этого фактора рекомендуется использование пробирок, покрытых изнутри слоем силикона (силиконированных).

**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.

Реактивы:

* 14% раствор магния сернокислого или 6% раствор ЭДТА (этилендиаминтетраацетат).

Эти реактивы предотвращают слипание тромбоцитов, способствуя их равномерному распределению в мазке.

Ход работы:

1. В капилляр Панченкова набирают один из реактивов до метки «75», выдувают в серологическую пробирку.
2. Этим же капилляром берут кровь из пальца до метки «0» (К), выдувают ее пробирку с реактивом, перемешивают.
3. 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.
4. Одновременно берут кровь для подсчета количества эритроцитов.

**Техника подсчета тромбоцитов**

Окрашенные мазки микроскопируют 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).

Расчет

Зная количество тромбоцитов, встретившихся при подсчете 1000 эритроцитов, и количество эритроцитов в 1л крови, производят расчет содержания тромбоцитов в 1л крови по формуле:

$$Х=\frac{А×В}{1000}$$

Где Х – количество тромбоцитов в 1л; А – количество тромбоцитов на 1000 эритроцитов; В – количество эритроцитов в 1л крови

**12 день производственной практики, 08.04.2020 г.**

Изучение методов определения осмотической резистентности эритроцитов.

Изменение осмотической резистентности эритроцитов является основным лабораторным показателем гемолитических анемий.

**Факторы преаналитического этапа, влияющие на осмотическую резистентность эритроцитов**

Нельзя использовать в качестве антикоагулянта оксалат или цитрат натрия.

Свежая кровь с антикоагулянтом сохраняется в течение 2 часов при комнатной температуре.

**Унифицированный метод определения осмотической резистентности эритроцитов**

Под резистентностью (стойкостью) клеток понимают их способность противостоять разрушительным воздействиям: осмотическим, механическим, тепловым, химическим и др. В клинической практике наибольшее распространение получило определение осмотической резистентности эритроцитов.

В растворе с осмотическим давлением, равным осмотическому давлению крови, эритроциты не изменяются. Солевой раствор, имеющий осмотическое давление, одинаковое с осмотическим давлением крови, называется изотоническим. Изотоническим солевым раствором для эритроцитов является 0,85% раствор хлорида натрия. Часто 0,85% раствор NaCl называют ещё физиологическим (физраствор).

В гипертонических солевых растворах эритроциты сморщиваются, а в гипотонических –набухают и разрушаются (гемолизируются). Осмотическую резистентность эритроцитов исследуют по отношению к гипотоническим растворам хлорида натрия разной концентрации. Концентрацию хлорида натрия, при которой начинают гемолизироваться первые, наиболее слабые эритроциты, принимают за начало гемолиза, а при которой разрушаются все эритроциты – за полный гемолиз.

Принцип: осмотическая резистентность эритроцитов определяется по степени их гемолиза в гипотонических растворах хлорида натрия.

Реактивы:

* Основной раствор, по осмотической концентрации соответствующий 10% хлориду натрия: двузамещенный фосфат натрия – 27,31 г; однозамещенный фосфат натрия – 4,86 г; хлорид натрия – 180 г; дистиллированная вода – до 2 л. рН основного раствора составляет 7,4
* Рабочий раствор – готовится из основного путем разведения в 10 раз. По осмотической концентрации он соответствует 1% раствору хлорида натрия
* Гепарин

Оборудование:14 центрифужных пробирок; пипетки на 5 мл, капилляры Сали; оборудование для прокола кожи; центрифуга, ФЭК.

Ход определения.

1. В две стерильные пробирки, содержащие по 2 капли гепарина, вносят по 1,5мл крови, хорошо перемешивают.
2. Кровь из одной пробирки используют сразу для исследования, а вторую ставят на сутки в термостат при 37ºС.
3. В 14 центрифужных пробирках готовят ряд разведений из рабочего раствора хлорида натрия в соответствии с таблицей:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № пробирок | Количество 1% NaCl, мл | Дистиллированная вода, мл | Концентрация NaCl | Экстинция, Е | Гемолиз, % |
| Исследования крови | В норме |
| 1 | 5,0 | - | 1% | контроль | 0% | 0 |
| 2 | 4,25 | 0,75 | 0,85% |  |  | 0 |
| 3 | 3,75 | 1,25 | 0,75% |  |  | 0 |
| 4 | 3,5 | 1,5 | 0,7% |  |  | 0 |
| 5 | 3,25 | 1,75 | 0,65% |  |  | 0 |
| 6 | 3,0 | 2,0 | 0,6% |  |  | 0 |
| 7 | 2,75 | 2,25 | 0,55% |  |  | 0 |
| 8 | 2,5 | 2,5 | 0,5% |  |  | 0-6% |
| 9 | 2,25 | 2,75 | 0,45% |  |  | 5-45% |
| 10 | 2,0 | 3,0 | 0,4% |  |  | 50-100% |
| 11 | 1,75 | 3,25 | 0,35% |  |  | 90-100% |
| 12 | 1,5 | 3,5 | 0,3% |  |  | 97-100% |
| 13 | 1,0 | 4,0 | 0,2% |  |  | 98-100% |
| 14 | 0,5 | 4,5 | 0,1% |  | 100% | 100% |

В каждую пробирку вносят по 1 капилляру Сали гепаринизированной крови.

Перемешивают содержимоеивсех 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 500-560 нм); кювета 10 мм; против холостой пробы.

Холостая проба – надосадочная жидкость в пробирке, содержащей 1% раствор NaCl (пробирка № 1).

На следующий день повторяют исследование с инкубированной кровью, так как при некоторых видах гемолитических анемий понижение осмотической резистентности эритроцитов выявляется только после инкубации.

Расчет

Процент гемолиза рассчитывают для пробирок № 2-13 (пробирка № 1 –холостая проба, гемолиз в пробирке № 14 принимается за 100%). Расчет ведут по формуле

$$Х=\frac{Е\_{Х}×100}{Е\_{14}}$$

Где X – процент гемолиза исследуемой пробы; Ех – экстинция исследуемой пробы; Е14 – экстинция надосадочной жидкости в пробирке с 0,1% NaCl (пробирка № 14); 100 – процент гемолиза в пробирке № 14.

Нормальные величины

В свежей крови начало гемолиза отмечается при концентрации хлорида натрия 0,5-0,45%, а полный гемолиз – при 0,4-0,35%.

Клинико-диагностическое значение

Исследование осмотической резистентности эритроцитов проводят при подозрении на гемолитическую анемию. Понижение осмотической резистентности эритроцитов, то есть появление гемолиза при более высокой, чем в норме, концентрации хлорида натрия (0,7-0,75%) характерно для наследственного микросфероцитоза.

Повышение осмотической резистентности эритроцитов наблюдается при талассемии и гемоглобинопатиях.

**13 день производственной практики, 09.04.2020 г.**

Изучение исследований крови с применением гематологических анализаторов.

Все многообразие гематологических приборов можно условно разделить на 3 класса:

1. 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, основанный на измерении разницы электропроводности клеток крови и разбавляющей жидкости.
2. 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. 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.

Работа с гематологическими анализаторами требует предельной аккуратности и точности, строгого соблюдения требований соответствующих инструкций к прибору. Большинство ошибок при работе с гематологическими анализаторами связано с техническими погрешностями: низкое качество разводящих жидкостей, погрешности при заборе крови, грязная посуда, удлинение интервала времени между забором крови и подсчетом клеток и т.д. Однако существуют ошибки, связанные с особенностями патологических образцов крови.

**Концентрация гемоглобина (HGB)** в большинстве гематологических анализаторов определяется гемиглобинцианидным методом. Некоторые особенности крови при заболеваниях могут привести к завышению результатов определения гемоглобина: лейкоцитоз более 30·109/л, парапротеинемия, гипербилирубинемия, внутрисосудистый гемолиз эритроцитов и др.

**Количество эритроцитов в единице объема крови (RBC)** гематологическими анализаторами определяется кондуктометрическим методом. Ошибки при подсчете количества эритроцитов, связанные с особенностями исследуемой крови, могут привести как к занижению результатов (гемолиз и агглютинация эритроцитов, наличие большого количества микроцитов и шизоцитов), так и к завышению результатов исследования (наличие патологически крупных тромбоцитов или их агрегатов, высокого лимфоцитоза с преобладанием малых лимфоцитов).

**Средний объем эритроцита (MCV)** выражается в фемтолитрах (фл). 1 фл = 1мкм3. Раньше для характеристики размеров эритроцитов крови проводили прямое измерение их диаметра с помощью окуляр-микрометра и затем строили график распределения эритроцитов по размерам (кривую Прайс-Джонса). Такое исследование является чрезвычайно трудоемким, требует измерения диаметра 500 эритроцитов с последующим расчетом процентного содержания эритроцитов определенного диаметра, но не позволяет точно характеризовать истинные размеры эритроцитов, так не учитывает формы клеток. В настоящее время точную характеристику объема эритроцитов получают на гематологических автоматах по величине MCV.

**Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC)** отражает количество граммов гемоглобина в 100мл эритроцитов, то есть отношение веса к объему эритроцитов. Это наиболее стабильный показатель, так как максимально возможная загрузка эритроцитов гемоглобином составляет 36г/100мл. Показатель используется как индикатор ошибки при подготовке пробы или в процессе работы прибора. Увеличение его более 36 г/дл свидетельствует о технических погрешностях. Диагностического значения он не имеет.

**Коэффициент анизотропии эритроцитов (RDW)** отражает различия в объеме эритроцитов, то есть степень анизоцитоза. Этот показатель дает количественную оценку разброса эритроцитов по объему. Нормальные величины коэффициента свидетельствуют о наличии в пробе крови однородной по объему популяции эритроцитов (нормо-, микро-или макроцитов). Увеличение коэффициента указывает на присутствие в крови разных по объему эритроцитов. В связи с этим коэффициент анизотропии следует оценивать только параллельно с анализом гистограммы эритроцитов и морфологическим исследованием мазка крови.

Эритроцитарная гистограмма – это графическое распределение эритроцитов по объему в результате анализа нескольких тысяч частиц объемом от 40 фл до 240 фл. Эритроцитарные гистограммы четко показывают наличие микроцитов, макроцитов или смешанной популяции эритроцитов.

**Количество тромбоцитов (PLT)** в автоматических счетчиках определяется прямым кондуктометрическим методом. Просчитываются частицы объемом 2-30 фл. При этом возможно занижение результатов из-за агрегации тромбоцитов, наличия макроформ тромбоцитов, прилипания

111тромбоцитов к лейкоцитам. Завышение количества тромбоцитов отмечается при большом количестве микроцитов и шизоцитов.

**Количество лейкоцитов (WBC)** гематологическим анализатором может быть заниженным при наличии агглютинатов лейкоцитов и завышенным –при наличии патологических макроформ тромбоцитов, агрегатов тромбоцитов, парапротеинемии и др.

Большинство гематологических анализаторов дифференцирует лейкоциты в зависимости от их объема на два, три, пять и более видов лейкоцитов. Результаты исследования отражаются в лейкоцитарных гистограммах и в цифровом выражении относительного и абсолютного количества различных видов лейкоцитов. Точная дифференцировка лейкоцитов на отдельные популяции, выявление тонких морфологических изменений возможны только с помощью микроскопического исследования окрашенного мазка крови. Дифференцированный подсчет лейкоцитов гематологическим анализатором –это скрининг, при котором все патологические результаты подлежат последующему микроскопическому исследованию.

**14 день производственной практики, 10.04.2020 г.**

Изучение методов определения группы крови.

Группа крови - это сочетание антигенов в эритроцитах, лейкоцитах, тромбоцитах и плазменных белках, которое генетически предопределено и не изменяется в течение жизни. Однако в практической трансфузиологии под группами крови традиционно понимают сочетания только антигенов эритроцитов системы АВ0.

К системе групп крови АВ0 относятся два групповых антигена - А и В и два вида антител, которые в настоящее время принято обозначать анти-А и анти-В антитела взамен использовавшихся ранее α- и β- изогемаггютининов. По международной терминологии название антител образуется путем добавления приставки «анти» к названию соответствующего антигена. Так, антитела анти-А обозначаются как анти-001.001 или анти-АВ0 1.

Уникальность системы АВ0 состоит в том, что в плазме у неиммунных людей имеются естественные антитела к отсутствующему на эритроцитах антигену. Во всех других системах эритроцитарных антигенов антитела не являются врожденными и могут появиться лишь вследствие антигенной стимуляции (после переливания крови, беременности).

Различные сочетания антигенов и антител системы АВ0 образуют 4 группы крови, которые по международной номенклатуре обозначаются только буквами по названию имеющихся антигенов: 0, А, В и АВ (без указания номера и имеющихся антител).

**0 группа крови** – на эритроцитах нет ни антигена А, ни антигена В;

**А группа** – на эритроцитах присутствует только антиген А;

**В группа** - на эритроцитах присутствует только антиген В;

**АВ группа** – на эритроцитах присутствуют антигены А и В.

Антигены системы АВ0 являются самыми сильными (иммуногенными) среди всех антигенов поверхности эритроцитов: АВ>D>К>с>Е>С>е.

**Методы определения групп крови**

До недавнего времени определение групп крови проводилось только одним методом – с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток. В настоящее время появились и находят все более широкое применение и другие, более современные, методы определения групп крови: с помощью моноклональных антител (цоликлонов анти-А и анти-В), гелевый метод, ПЦР-анализ.

Определение групп крови в ЛПУ и УСК проводится в соответствии с приказом МЗ РФ № 2 от 9.01.98 «Об утверждении инструкций по иммуносерологии».

Классификация методов определения групп крови системы АВ0

I. Методы, в основе которых лежит реакция агглютинации в солевой среде:

1) прямая реакция:

* с поликлональными реагентами;
* с моноклональными реагентами;

2) перекрестный метод.

1. II. Методы гелевой технологии (сочетание реакции агглютинации и гель-фильтрации).

III. Молекулярно-генетические методы (ПЦР-анализ).

Наиболее широко для определения групп крови используются методы, основанные на реакции агглютинации:

1) **прямая (простая) реакция**, при которой группа крови определяется по наличию на эритроцитах антигенов, выявляемых с помощью реагент-диагностикумов, содержащих анти-А и анти-В-антитела (стандартных изогемагглютинирующих сывороток I-III групп или цоликлонов анти-А и анти-В). Прямая реакция используется для первичного определения групп крови в лаборатории СПК и лечащим (дежурным) врачом в больнице.

2) **перекрестный метод (прямая + обратная реакция)**, при котором производится одновременное выявление антигенов эритроцитов с помощью стандартных сывороток и антител сыворотки с помощью стандартных эритроцитов (обратная реакция). Перекрестный метод используется для компетентного определения группы крови, которое проводится в подтверждающей лаборатории специалистом-иммуногематологом. При этом результаты прямой и обратной реакции обязательно должны совпадать. Любое несоответствие этих результатов требует уточнения и дополнительных исследований.

Реагенты для определения групп крови системы АВ0

В качестве реагент-диагностикумов групп крови длительное время использовали только сыворотки доноров с известной группой крови (стандартные изогемагглютинирующие сыворотки). В настоящее время для этих целей широко используются также продукты биотехнологии – моноклональные реагенты (цоликлоны).

Реагенты для определения групп крови делятся на 2 группы:

1. Специфические реагенты – содержат анти-А и анти-В-антитела, дающие с соответствующими антигенами специфическую реакцию агглютинации:
* поликлональные реагенты – содержат, кроме анти-А и анти-В-антител, антитела другой специфичности (стандартные изогемагглютинтрующие сыворотки I-IV групп);
* моноклональные реагенты – содержат антитела определенной специфичности и не содержат никаких других антител (цоликлоны анти-А, анти-В, анти-АВ, анти А+В, анти-А1).
1. Неспецифические реагенты – вещества, получаемые из растений и низших животных, способные связывать определенные антигены на поверхности эритроцитов, в результате чего наступает агглютинация клеток:
* фитогемагглютинины (лектины) – для выявления антигена А1;
* реагент для выявления антигена А2 (экстракт виноградных улиток).

Содержащиеся в специфических реагентах антитела анти-А и анти-В относятся к полным антителам - иммуноглобулинам класса М (IgM), которые дают реакцию агглютинации с соответствующими антигенами в солевой среде при комнатной температуре.

**Метод агглютинации в геле**

Гелевая технология определения групп крови предложена французским ученым Лаперье в 1989г. с целью стандартизации реакций гемагглютинации и получения достоверных результатов.

Суть метода заключается в том, что вместо пластинок и пробирок реакция агглютинация проводится в геле - СЕФАДЕКС, состоящем из полиакриламидных шариков, сходных по размеру с эритроцитами. Гелем сефадекс заполняют микропробирки, вмонтированные в пластиковые карты. После добавления к гелю эритроцитов и специфических антител пластиковые карты центрифугируют в специальных центрифугах. Если реакции агглютинации нет, то не склеенные эритроциты под действием центробежной силы свободно проходят через гель, формируя на дне микропробирки компактный осадок красного цвета. При положительной реакции агглютинаты эритроцитов из-за больших размеров задерживаются на поверхности геля или в его толще. Если образовавшиеся агглютинаты эритроцитов задержались на поверхности геля, сила реакции оценивается как 4+; при расположении их в верхней трети столбика геля – как 3+, в верхних двух третях – как 2+; в нижней трети геля – как 1+. Если эритроциты образуют компактный осадок на дне микропробирки - реакция отрицательна (агглютинации нет).

Для проведения тестов используются 3 вида геля:

* нейтральный гель, не содержащий специфических антител – применяется в контрольных микропробирках и для идентификации антител;
* специфический гель, содержащий антитела (моноклональные или поликлональные) к антигенам эритроцитов человека – применяется для определения групп крови, резус-принадлежности, антигена Келл и других антигенов эритроцитов всех известных систем;
* антиглобулиновый гель, содержащий антитела к иммуноглобулинам человека – применяется для пробы Кумбса, при поиске и идентификации иммунных антител, пробе на совместимость крови донора и реципиента.

В пластиковые идентификационные карты (ID карты) Dia Med встроено по 6 микропробирок. В пяти пробирках содержится смесь геля и реагентов, содержащих определенные антитела, а контрольная (шестая) пробирка содержит нейтральный гель без антител (ctl). Пробирки в ID-карте маркируются по выявляемым антигенам. Например:

А-В-АВ-D-DСЕ-Ctl (для определения группы крови системы АВ0 и резус-фактора);

C-c-E-e-K-Ctl (для выявления антигенов системы резус и Келл).

К преимуществам гелевого метода относятся высокая чувствительность и специфичность, возможность количественной оценки силы агглютинации, выявления слабых вариантов антигенов (А2 и DU) и кровяных химер, использование минимального количества крови (15мкл) для максимального спектра исследований и др.

Метод гелевой технологии находит все более широкое распространение в практической медицине.

**Молекулярно-генетические методы (ПЦР-анализ)**

Самым совершенным методом определения антигенов крови в настоящее время является метод полимеразной цепной реакции. Он проводится с помощью антиген-специфических праймеров и выявляет антигены на уровне ДНК. Метод обладает очень высокой чувствительностью и позволяет использовать для исследования чрезвычайно малые количества материала, причем практически любого (высохшие следы крови, кусочки любой ткани и т.д.).

Из-за высокой стоимости ПЦР-анализ пока используется в основном в НИИ.

**15 день производственной практики, 11.04.2020 г.**

Методический день: заполнение дневника.

**16 день производственной практики, 13.04.2020 г.**

Изучение методов определения резус-принадлежности.

Система антигенов эритроцитов Резус, вторая по активности после системы АВ. В настоящее время насчитывает более 75 антигенов, пять из которых относятся к значимым в клинической практике: D, C, с, Е, е. Отсутствие антигена D обозначают буквой d.

Система Резус в отличие от системы АВ0 не имеет естественных антител. Антитела антирезус появляются только после иммунизации резус-отрицательного организма в результате переливания резус-положительной крови или беременности резус-положительным плодом. У сенсибилизированных лиц антитела к резус-антигенам сохраняются несколько лет, иногда на протяжении всей жизни и при повторном контакте с антигенами резус вызывают гемолиз эритроцитов (посттрансфузионные гемолитические осложнения, гемолитическую болезнь новорожденных.

Самым сильным («мажорным») антигеном системы Резус является антиген D, который и подразумевается под термином «резус-фактор». Именно по наличию или отсутствию на эритроцитах антигена D кровь делится на резус-положительную и резус-отрицательную. Различные сочетания антигенов резус в крови отдельных людей составляют 28 групп (фенотипов) системы Резус. Фенотип человека представляет собой набор антигенов резус, который содержит по антигену каждого вида от обоих родителей. Например: при генотипах родителей CDe/cDе фенотип их ребенка будет СсDеe. В 14 фенотипах содержится антиген D – они являются резус – положительными, а другие 14 не содержат антигена D – их относят к резус – отрицательным. Однако такая оценка резус-принадлежности крови применяется лишь для реципиентов.

У доноров же принцип деления крови на резус-положительную Rh (+) и резус-отрицательную rh (-) несколько иной. Доноры считаются rh(-), если у них на эритроцитах не содержится ни антиген D, ни антиген С, ни антиген Е, то есть при фенотипе ccddee. Это связано с тем, что, хотя антигены С и Е менее активны, чем D, к ним также могут вырабатываться антитела.

Распространенность антигена D в разных регионах Земли разная. У европеоидов, в том числе и в РФ, доля rh(-) лиц составляет в среднем 14-16%, в то время как среди монголоидов rh(-) фенотип встречается менее чем у 1% населения, и резус-конфликты у них чрезвычайно редки.

По сравнению с антигеном D иммуногенность других антигенов системы резус («минорных», то есть более слабых) значительно ниже и убывает в следующем ряду: D>с>Е>С>е.

Характерной чертой антигенов системы Резус является мозаицизм (неоднородность). Все антигены системы Резус имеют разновидности – варианты: Dweak, Dpartial, Cw, Ew, однако практическое значение имеют только варианты антигена D. Dweak относится к слабой разновидности антигена D, а при Dpartial на эритроцитах присутствует измененный антиген D. Для удобства в повседневной работе слабые варианты антигена D объединяют в группу Du, частота которой составляет около 1%. Эритроциты, несущие антиген Du, в отличие от эритроцитов с антигеном D, не аггютинируются полными антителами анти-D в солевой среде, а дают агглютинацию только с неполными антителами анти-D в коллоидной среде. При наличии на эритроцитах антигена Du кровь реципиентов и беременных женщин относят к резус-отрицательной, а кровь доноров – к резус-положительной. Не допускается переливание крови с антигеном Du резус-отрицательным реципиентам, так как это может вызвать у них образование антител анти-Du.

Определение резус-принадлежности крови проводится с помощью реакции агглютинации исследуемых эритроцитов с реагентами, содержащими антитела к антигенам системы Резус: анти-D, анти-С, анти-, анти-Е, анти-е. В зависимости от свойств содержащихся в них антител различают несколько видов реагентов анти-резус.

1. Реагенты, содержащие неполные антитела анти-резус (Ig G). Они дают реакцию агглютинации только в коллоидной среде (конглютинацию). В солевой среде IgG лишь соединяются с эритроцитами, содержащими одноименные антигены, но не вызывают их агглютинации, так что внешне эта реакция никак не проявляется. Чтобы установить, произошла ли фиксация неполных резус-антител на эритроцитах, необходимо добавление коллоидов (желатина, полиглюкина), увеличивающих вязкость среды и приближающих эритроциты друг к другу настолько, что даже Ig G образуют агглютинаты. Реагенты, содержащие неполные антитела, могут быть моноклональные и поликлональные.

А) Поликлональные реагенты - содержат неполные антитела анти-резус, а также антитела иной специфичности (антибактериальные, антивирусные и др.). Поликлональные реагенты готовятся из сыворотки крови людей, в которой содержатся активные антитела анти-резус. К поликлональным реагентам анти-резус относятся:

* стандартные сыворотки антирезус с неполными антителами в чистом виде (анти-D, анти-С, анти-с, анти-Е, анти-е), а также их сочетания (анти-DС, анти-DЕ, анти-DСЕ);
* стандартный универсальный реагент антирезус анти-D, анти-DС, анти-DСЕ и др.

Б) Моноклональные реагенты – содержат неполные антитела анти-резус определенной специфичности и не содержат никаких других антител:

- цоликлон анти-D и др.

2. Реагенты, содержащие полные антитела (Ig M) к антигену D, вызывают агглютинацию эритроцитов в солевой среде. Они также могут быть:

А) поликлональные: стандартная сыворотка антирезус анти-D с полными антителами;

Б) моноклональные: цоликлоны анти-D супер, анти-С супер, анти-Е супер и др.

Антиген D может быть выявлен любым из перечисленных выше реагентов антирезус анти-D, содержащим как полные, так и неполные антитела. В настоящее время в большинстве УСК антиген D выявляют реакцией агглютинации на плоскости с помощью цоликлона анти-D супер.

Исследованию на Du подвергаются образцы крови, в которых не содержится антиген D. Для выявления антигена Du необходимо проведение двух проб: с полными и неполными антителами анти-D. Сочетание отрицательной реакции с полными антителами и положительной реакции с неполными антителами свидетельствует о наличии в крови антигена Du. При определении резус-принадлежности крови с помощью гелевого теста не требуется проведения дополнительных исследований на Du. Сила реакции с реактивом анти-D от (+1) до (+3) указывает на антиген Du, а реакция (+4) – на антиген D. Минорные антигены системы Резус (C, c, E, e) выявляются с помощью реагентов, содержащих соответствующие антитела: анти-С, анти-с, анти-Е, анти-е, которые могут быть полными и неполными, в чистом виде или в сочетании с антителами анти-D (DC, DE, DCE).

**17 день производственной практики, 14.04.2020 г.**

Изучение регистрации исследований в гематологической лаборатории и проведение санитарных мероприятий.

Каждый сотрудник лаборатории должен использовать одни и те же формы (бланки результатов анализов) для сообщения полученных результатов.

Форма бланка должна содержать название лаборатории и медицинский организации; информацию о пациенте, достаточную для его идентификации; название биологического материала и всех исследуемых показателей; дату получения пробы и, если это необходимо, время получения; результаты исследования; референтные интервалы; фамилию и подпись сотрудника, выполнившего исследование. Порядок выдачи результатов должен быть определен инструкцией, утвержденной руководителем медицинской организации.

Для регистрации исследований также применяются **лабораторные информационные системы (ЛИС)**.

Назначение ЛИС:

1. Увеличение производительности лаборатории.

Исключение необходимости ручной и повторной регистрации. Повышение эффективности использования анализаторов. Исключение рукописных журналов и отчетов. Оперативность информационного взаимодействия с заказчиком. Устранение ошибок рукописной регистрации. Устранение ошибок идентификации бланков и проб. Контроль качества выполнения исследований.

1. Повышение качества работы лаборатории. Ведение архива результатов исследований. Надежное сохранение результатов. Повторная выдача результатов. Использование динамики результатов. Ведение учета лаборатории. Учет выполненных исследований, количества и стоимости оказанных услуг, материальных ресурсов, рабочего времени.

**Инструкция по сбору, обезвреживанию, хранению и транспортировке медицинских отходов класса «Б» в клинико-диагностической лаборатории**

Виды отходов:

**Класс «А»**: неопасные отходы: картонная упаковка от перчаток и масок, неинфицированная поэтиленовая упаковочная пленка, бахилы и т.д, крупногаборитные отходы (мебель, оборудование, не содержащие токсические элементы), упаковки от лекарственных средств.

**Класс «Б»:** опасные (рискованные) отходы: использованные салфетки, иглы, шприцы, перчатки, маски, все то, что соприкасалось с биологическими жидкостями больного.

**Класс «В»:** отходы чрезвычайно опасные. Материалы, контактирующие с больными особо опасными инфекциями. Отходы с лабораторий, работающих с микроорганизмами 1-2 групп патогенности. Отходы фтизиатрических, микологических больниц. Отходы от пациентов с анаэробной инфекцией

**Класс «Г»:** отходы по составу близкие к промышленным: отработанные моющие и дезинфицирующие средства, дезсредства с истекшим сроком годности, люминисцентные и бактерицидные лампы, отходы лекарств и т.д. цитостатики и другие хим.препараты.

**Класс «Д»:** Радиоактивные отходы. Все виды отходов, содержащие радиоактивные компоненты.

# Схема сбора и удаления отходов класса «Б»

 Перчатки, салфетки, маски, и т.д. помещаются в одноразовые пакеты желтого цвета, закрепленные внутри многоразовой емкости. Пакет перфорированный. Мешок или контейнер заполняется на ¾.После заполнения пакета, ответственное лицо в перчатках и маске, сцеживает дезсредство, маркирует герметизирует. Перфорированный мешок с отходами помещает во второй, целый мешок, маркирует.

 Иглы, лезвия, скальпели, шприцы, системы и т.д. помещаются в одноразовые твердые емкости с дезсредством. Контейнер заполняется на ¾, может заполняться в течение 72 часов, закрывается крышкой.

 Отходы класса «Б» транспортируются на стойке-тележке для отходов или в транспортном контейнере. Перемещение отходов за пределами подразделений в открытых емкостях запрещается.

Помещение для временного хранения медицинских отходов оборудовано:

1. Пол – выложен керамической плиткой
2. Стены – глазурованной плиткой
3. Потолок покрыт влагостойкой краской
4. Помещение оборудовано:
* Умывальником
* Поливочным краном
* Стоком воды
* Бактериальным облучателем
* Вытяжкой механической вентиляцией с естественным притоком

Помещение для временного хранения медицинских отходов подвергается уборке: текущая - 1раз в день, генеральная – 1 раз в неделю, кварцевание по графику

Правила техники безопасности при сборе медицинских отходов.

Запрещается:

* вручную разрушать, разрезать, отходы классов «Б» и «В», в том числе использованные системы для внутривенных вливаний;
* снимать вручную иглу со шприца после его использования, надевать колпачок на иглу после инъекции;
* пересыпать неупакованные отходы классов «Б» и «В» из одной емкости в другую;
* утрамбовывать отходы классов Б и В;
* осуществлять любые операции с отходами без перчаток или необходимых средств индивидуальной защиты и спецодежды;
* использовать мягкую одноразовую упаковку для сбора острого медицинского инструментария и иных острых предметов;
* устанавливать одноразовую упаковку и многоразовые баки для сбора отходов на расстоянии менее 1 метра от нагревательных приборов;
* смешивать отходы различных классов в общей емкости;
* вывозить необеззараженные отходы класса «Б» и «В» за пределы территории диспансера;
* стирать спецодежду на дому;

При нарушении целостности одноразового пакета (разрыв, разрез) его необходимо поместить в другой одноразовый пакет и произвести повторную герметизацию.

В случае рассыпания (разливания) необеззараженных потенциально инфицированных отходов следует провести их дезинфекцию на месте аварии с использованием соответствующих дезинфицирующих средств. Сбор рассыпанных (разлитых) отходов проводят по истечению времени экспозиции.

 В случае возникновения аварии необходимо уведомить о произошедшем непосредственного руководителя.

Демеркуризация проводится персоналом в случае небольших аварийных ситуациях, согласно инструкции по демеркуризации очага ртутного загрязнения.

**18 день производственной практики, 15.04.2020 г.**

Защита дневника производственной практики.

**ОТЧЕТ ПО ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ПРАКТИКЕ**

Ф.И.О. обучающегося Лебедева Полина Юрьевна

группы\_\_\_\_405\_\_\_ специальности Лабораторная диагностика

Проходившего (ей) производственную практику с 26.03 по 15.04 2020г

За время прохождения практики мною выполнены следующие объемы работ:

1. Цифровой отчет

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№** | Виды работ | **Количество** |
| 1. | - изучение нормативных документов, регламентирующих санитарно-противоэпидемический режим в КДЛ: | 9 |
| 2. | - прием, маркировка, регистрация биоматериала.- получение плазмы и сыворотки из венозной крови. | 1 |
| 3. | - приготовление реактивов, - подготовка оборудования, посуды для исследования | 12 |
| 4. | *Определение гематологических показателей* *-*определение гемоглобина-определение СОЭ-определение количества лейкоцитов-определение количества эритроцитов-приготовление мазка крови-окрашивание мазков крови-подсчёт лейкоцитарной формулы- супровитальная окраска ретикулоцитов-подсчет ретикулоцитов в мазке крови-определение гематокрита -определение длительности кровотечения - определение время свёртывания крови-определение количества тромбоцитов-определение осмотической стойкости эритроцитов- определение групп крови- определение резус принадлежности крови-определение гематологических показателей на гематологическом анализаторе | 25 |
| 5 | - Регистрация результатов исследования. | 1 |
| 6 | - проведение мероприятий по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты; - утилизация отработанного материала. | 1 |

# 2. Текстовой отчет

|  |
| --- |
| 1. Умения, которыми хорошо овладел в ходе практики:
 |
| Работа с нормативными документами, регламентирующими санитарно- |
| противоэпидемический режим в КДЛ; прием, маркировка, регистрация  |
| биоматериала, получение плазмы и сыворотки из венозной крови;  |
| определение гематологических показателей ручными методами и с помощью  |
| гематологических анализаторов, в том числе группы крови и  |
| резус-принадлежности; регистрация результатов исследования; проведение  |
| стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, |
| средств защиты, утилизация отработанного материала |
|  |
| 1. Самостоятельная работа:
 |
| Работа с нормативными документами, регламентирующими санитарно- |
| противоэпидемический режим в КДЛ; прием, маркировка, регистрация  |
| биоматериала, получение плазмы и сыворотки из венозной крови;  |
| определение гематологических показателей ручными методами и с помощью  |
| гематологических анализаторов, в том числе группы крови и  |
| резус-принадлежности; регистрация результатов исследования; проведение  |
| стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, |
| средств защиты, утилизация отработанного материала |
| 1. Помощь оказана со стороны методических и непосредственных руководителей:
 |
| Заполнение дневника. |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
| 1. Замечания и предложения по прохождению практики:
 |
| Замечаний нет. |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |

Общий руководитель практики **\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

*(подпись) (ФИО)*

М.П.организации

## **ХАРАКТЕРИСТИКА**

**\_\_\_\_\_\_\_\_Лебедева Полина Юрьевна\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

*ФИО*

обучающийся (ая) на \_\_4\_\_\_курсе по специальности СПО

**31.02.03. Лабораторная диагностика**

успешно прошел (ла) производственную практику по профессиональному модулю: **Проведение лабораторных гематологических исследований**

 *наименование профессионального модуля*

в объеме\_\_\_108\_\_часов с «26» марта 2020 г. по «15» апреля 2020 г.

в организации КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А. И. Крыжановского», 660133, г. Красноярск, ул. 1-ая Смоленская, 16

*наименование организации, юридический адрес*

За время прохождения практики:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № ОК/ПК | Критерии оценки  | Оценка (да/нет) |
| ПК2.1, ОК13 | В процессе подготовки к исследованию правильно выбирает и готовит посуду, реактивы и приборы в соответствии с методикой |  |
| ПК2.2 |  Правильно проводит забор капиллярной крови. |  |
| ПК 2.3ОК 2 | Проводить общий анализ крови и дополнительные гематологические исследования; участвовать в контроле качества. |  |
| ПК2.4, ОК 11 | Соблюдает форму заполнения учетно-отчетной документации (журнал, бланки). |  |
| ПК 2.5 | Проводит мероприятия по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты. Утилизирует отработанный материал в соответствии с инструкциями и СанПин. |  |
| ОК 1 | Демонстрирует интерес к профессии. Внешний вид опрятный, аккуратный. |  |
| ОК 6 | Относится к медицинскому персоналу и пациентам уважительно, отзывчиво, внимательно. Отношение к окружающим бесконфликтное. |  |
| ОК 7 | Проявляет самостоятельность в работе, целеустремленность, организаторские способности.  |  |
| ОК 9 | Способен освоить новое оборудование или методику (при ее замене). |  |
| ОК 10 | Демонстрирует толерантное отношение к представителям иных культур, народов, религий. |  |
| ОК 12 | Способен оказать первую медицинскую помощь при неотложных ситуациях |  |
| ОК14 | Соблюдает санитарно-гигиенический режим, правила ОТ и противопожарной безопасности. Отсутствие вредных привычек. Участвует в мероприятиях по профилактике профессиональных заболеваний |  |

«\_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_20\_\_ г.

Подпись непосредственного руководителя практики

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_/ФИО, должность

Подпись общего руководителя практики

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_/ФИО, должность

 м.п.

**Аттестационный лист производственной практики**

Студент (Фамилия И.О.) \_\_\_Лебедева Полина Юрьевна\_\_\_

Обучающийся на 4 курсе по специальности 31.02.03 «Лабораторная диагностика»

при прохождении производственной практики по

 ПМ 02 Проведение лабораторных гематологических исследований

с 26.03 2020 г. по 15.04 2020 г. в объеме \_180\_ часов

в организации КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А. И. Крыжановского»

освоил общие компетенции (перечень ОК)\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

ОК-1, ОК-2, ОК-3, ОК-4, ОК-5, ОК-6, ОК-7, ОК-8, ОК-9, ОК-10, ОК-11, ОК-12, ОК-13, ОК-14

 освоил профессиональные компетенции (перечень ПК, соответствующего МДК)  ПК-2.1, ПК-2.2, ПК-2.3, ПК-2.4, ПК-2.5

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № п/п | Этапы аттестации производственной практики | Оценка  |
|  | Оценка общего руководителя производственной практики |   |
|  | Дневник практики |  |
|  | История болезни/ индивидуальное задание  |  |
|  | Дифференцированный зачет |  |
|  | Итоговая оценка по производственной практике |  |

Дата \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Ф.И.О. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 (подпись общего руководителя производственной практики от организации)

МП организации

Дата методический руководитель \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Ф.И.О.\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 (подпись)

МП учебного отдела