	ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ ТОКСИКОЛОГИИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫМ ПРОИЗВОДСТВОМ		
СОП №:	Номер версии:		Число страниц:
III/3П-1-010-2022/3	3		8
	Дата начала действия версии СОП:		Дата окончания действия версии СОП:
	16.05.2022		16.05.2024
Наименование СОП:	**Приготовление мазков крови и их окрашивание**		
Составление, утверждение и пересмотр СОП			
Составлено/ Пересмотрено:	_____ подпись	29.06.2020/ 29.04.2022 дата	С.А. Лебедева
Проверено: Руководитель СОК	_____ подпись	30.04.2022 дата	В.Н. Перфилова
Утверждено: Руководитель лаборатории	_____ подпись	11.05.2022 дата	Л.И. Бугаева
Форма обучения:	чтениеV		практические занятия V

1. НАЗНАЧЕНИЕ СОП

1.1. ЦЕЛЬ: описать процедуру приготовления, фиксации и окрашивания мазков крови тест-систем при проведении неклинических исследований.

1.2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

СОП предназначена персоналу группы биохимии и гематологии ИЦ, выполняющему манипуляции по приготовлению, фиксации и окрашиванию мазков крови ТС при проведении доклинических исследований. Данная СОП является обязательной для изучения для сотрудников группы биохимии и гематологии.

2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

2.1. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1700-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33044—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г. Настоящий стандарт идентичен

международному документу OECD Guide 1:1998 OECD Principles of good laboratory practice).

2.2 Директива 2010/63/eu Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г по охране животных, используемых в научных целях.

3. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

За выполнение данной СОП персональную ответственность несет сотрудник, выполняющий приготовление мазков, фиксацию и их окрашивание.

4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

СОП применяется при проведении доклинических исследований на ТС для приготовления мазков крови, фиксации и их окрашивании. Исследование мазков крови позволяет относительно быстро уточнить и дополнить полученную информацию. Этот способ способствует выявлению некоторых элементов, которые не проявляются при проведении автоматизированных клинических исследований крови (например, изменение формы эритроцитов, сдвиг лейкоцитарной формулы и.т.д.).

5. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1. Стандартные операционные процедуры (СОП) (Standard Operating Procedures (SOPs): Документально оформленные процедуры, в которых описано, как проводить исследования или виды деятельности, обычно не указанные подробно в протоколах/планах/программах или указаниях по проведению исследований

2. Тест-система (Test system): Используемая в исследовании биологическая, химическая, физическая система, аналитическое оборудование или их комбинация.

6. СПИСОК СОРАЩЕНИЙ

СОП – стандартная операционная процедура.

ТС по тексту встречается

7. ПРИМЕНЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ/ИНСТРУМЕНТЫ/РЕАКТИВЫ

Материалы и оборудование

- обезжиренные стекла;
- этиловый спирт;
- пинцет;
- банка с притертой крышкой;
- свежезабранная кровь тест-систем;
- шпатель для растяжки мазков;
-простой карандаш;
-готовый фиксатор (раствор) типа Лейшмана (возможны варианты);
- готовый фиксатор-краситель: эозин метиленовый синий типа Лейшмана (раствор) и эозин мителеновый синий по Май-Грюнвальду (раствор);
-готовый краситель (раствор) краски Романовского — Гимза
-штатив для стекол крови;
- очищенная вода;
- кювета для окрашивания крови.

8. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ

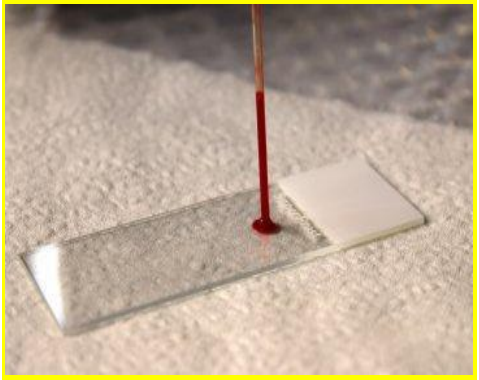
8.1. При необходимости обработать стекла этанолом.

Выполнение:

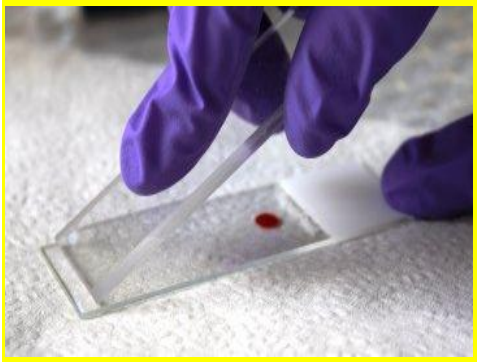
1. Стекла насухо вытирают чистым полотенцем и хранят в широкогорлой чистой посуде с притертой пробкой или в упаковках производителя (можно использовать подготовленные производителем стекла).



8.1. Поместить небольшую каплю венозной крови на предметное стекло, с помощью стеклянной капиллярной пипетки, (или непосредственно из места укола каплю крови) на конец предметного стекла. Избегать при этом всякого контакта между проколотым участком и стеклом.)



8.2. Оставить стекло в горизонтальном положении.



8.3. Размазать каплю крови по стеклу с помощью чистого шпателя для крови (шлифованного стекла), помещая его под углом 45°; коротким ребром, подождав, пока вся кровь расплывется по нему

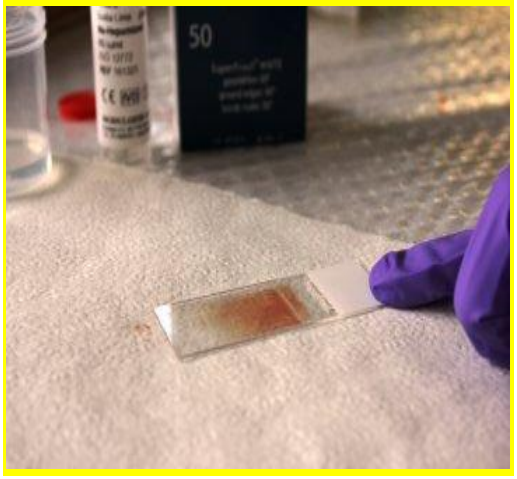


8.4. Как только кровь растеклась по ребру, быстрым движением от капли провести по предметному стеклу.



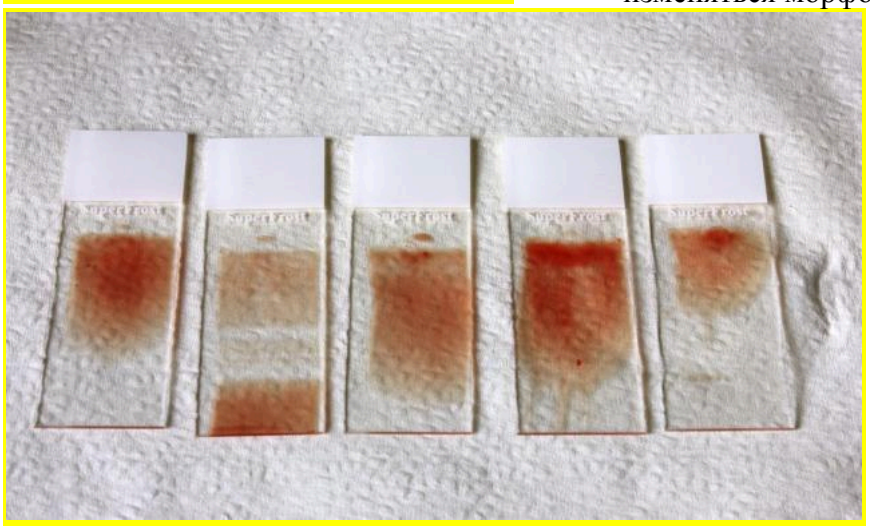


8.5. Не следует сильно нажимать на стекло, так как при этом травмируются форменные элементы крови.



8.6. После приготовления мазки быстро сушат на воздухе до исчезновения влажного блеска. Подсушить мазок можно, подержав его над лампой или помахав им в воздухе. Хорошо сделанный мазок тонок, имеет желтоватый цвет и оканчивается «метелочкой».

Густо-розовые и красноватые мазки непригодны для счета, так как они слишком толсты и клеточные элементы при этом дифференцировать невозможно. При медленном высыхании может изменяться морфология клеток.



Техника мазка - слева направо:
Мазок 1 - Идеальный мазок

Мазок 2 – В момент размазывания мазка произошла остановка.
Мазок 3 – Перекос мазка.
Мазок 4 - Капля крови слишком большая.
Мазок 5 - Мазок слишком короткий.
8.7. Мазки раскладывают на столе (лотке) кровью вверх слева-направо в том порядке, в каком были изготовлены;
8.8. Когда мазки высохли, проводят их маркировку при помощи простого карандаша по краю с указанием даты изготовления, порядкового номера мазка, номера и пола ТС.
8.9. Мазки складывают в штатив для мазков и переносят в комнату для их окраски.
8.10. Фиксация и окраска мазков крови. Данную процедуру необходимо провести в течение 2х дней (зафиксировать или окрасить).
8.11. Налить в кюветы с фиксатором (фиксатор Лейшмана или Май-Грюнвальда), **р**аствор, который обеспечивает предварительную окраску и фиксацию препаратов крови, погрузить в него штатив с мазками, так чтобы они были полностью погружены в раствор. Выдержать 3-5 мин. Достать мазки высушить и окрасить.
8.12. Метод Романовского— Гимза. Фиксированные препараты в штативе опускают в кювету и наливают под них рабочий раствор краски (к 1 мл дистиллированной воды добавляют 2 капли фабричного раствора краски Романовского — Гимза). Окрашивание продолжается 15 — 30 мин. Продолжительность окраски зависит от окружающей температуры (чем холоднее, тем продолжительнее окраска) и качества красителя. В заключение мазки промывают очищенной водой и сушат на воздухе.
8.13. Использованные растворы вылвают в раковину.

9. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

9.1. Березовская И.В., Иванова В.М. Актуальные проблемы безопасности дженериков //Бюллетень ВНЦ БАВ. - Старая Купавна, 2002. - С. 37-52.
9.2. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсикологического действия. - Л.: Медицина, 1986. - С. 279.
9.3. Кост Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / М.: Медицина, 1975. – 382 с.
9.4. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского и В.А. Филова. — М.: Медицина, 2002. - С. 606.
9.5. ПРАВИЛА НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ ЕВРАЗИЙСКОГО ЭКОНОМИЧЕСКОГО СОЮЗА GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP). Проект по состоянию на 20.03.2015.
9.6. Проблема нормы в токсикологии / Под ред. проф. И.М. Трахтенберга. - М.: Медицина, 1991. - С. 204.
9.7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая / под ред. А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К, 2012. - 536 с.
9.8. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Под ред. Макарова В.Г, Макаровой М.Н. - СПБ.: Изд-во «ЛЕМА», 2013. - 116 с.

10. ПРИЛОЖЕНИЯ

Не применимо.

Лист регистрации изменений от 29.04.2022 в СОП № III/3П-1-010-2022/3 версия 3

№ изм	№ стр.	№ пункта	Внесенные изменения
1	1	номер СОП	Добавлен номер версии в номер в СОП……/3
2	1-2	Титул. лист	*В заглавной части титульного листа удалено:* «Дата утверждения» и строка «Составление, утверждение и пересмотр СОП». *В заглавной части титульного листа* «Дата пересмотра» *заменено* на «Дата окончания действия версии СОП»; «Составлено» *заменено* на «Составлено/пересмотрено». *Из колонтитула СОП удалено:* «Дата начала действия».
3	1-6	1-10	*Изменены названия и порядок пунктов СОП:* - изменено название пункта 1 с НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ на НАЗНАЧЕНИЕ СОП; - пункт 3. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ изменен на пункт 2. - пункт 4. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ изменен на пункт 3. - пункт 7. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ изменен на пункт 4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ; - название пункта 8. ПРИМЕНЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ /ИНСТРУМЕНЫ изменено на пункт 7. ПРИМЕНЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ/ИНСТРУМЕНЫ /РЕАКТИВЫ; - пункт 9. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ изменен на пункт 8. - пункта 10. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТРЫ изменен на пункт 10. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ; - добавлен пункт 10. ПРИЛОЖЕНИЯ.
4	1	1	*Изменена Цель СОП* 1.1. ЦЕЛЬ: описать процедуру приготовления, фиксации и окрашивания мазков крови с последующим подсчетом форменных элементов крови тест-систем при проведении неклинических исследований. добавлено: 1.2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП предназначена персоналу отдела гематологии и биохимии лаборатории токсикологии ИЦ, выполняющему манипуляции по приготовлению, фиксации, окрашиванию мазков и подсчету форменных элементов крови ТС, при проведении доклинических исследований. Данная СОП является обязательной для изучения для сотрудников отдела гематологии и биохимии.
5	1-2	2	*Из пункта удалено:* Данный СОП предназначен для сотрудников лаборатории токсикологии, имеющих соответствующую профессиональную подготовку и опыт работы, изучивших требования настоящей стандартной операционной процедуры, прошедшие инструктаж по работе с животными и получивших допуск к проведению данной процедуры.

			Данный СОП описывает процедуры подготовку стекло и изготовления мазков крови унифицированным методом у мелких лабораторных животных для проведения токсикологических исследований с целью дальнейшего подсчета ее форменных элементов после предварительной окраски.
6	1-2		*Удалено:* **НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ** 1. Приказ Минздрава России от 01.04.2016 N 199н "Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики". 2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с. 3. Европейская Конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей CETS 123 (Страсбург, 1986). *Добавлено:* **3. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ** За выполнение данной СОП несет персональную ответственность сотрудник, выполняющий приготовление мазков для подсчета форменных элементов крови под микроскопом.
7	2	4.	*Удалено:* **4.ОТВЕТСТВЕННОСТЬ** За выполнение данной процедуры отвечает сотрудник лаборатории, прошедший обучение и допущен до проведения данной процедуры. *Добавлено:* **4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ** СОП применяется при проведении доклинических исследованиях на ТС для приготовления мазков крови.
8	2	5	*Удалено:* **5. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ.** **Первичные данные (raw data) -** оригиналы записей и документов испытательного центра или их заверенные копии, отражающие результаты наблюдений и процедуры, проведенные во время исследования. **Кровь** – **Лейкоциты** **Мазок** периферической **крови** – **Лейкоцитарная формула** (**лейкограмма**) –
9	3	8	*Удалено:* **8.ПРИМЕНЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ / ИНСТРУМЕНТЫ** **Материалы и оборудование** 1. Новые стекла или бывшие в употреблении; 2. Эмалированная кастрюля; 3. Хозяйственное мыло; 4. Стерильная ветошь; 5. Этиловый спирт; 6. Пинцет; 7. Банка с притертой крышкой;

			8. Свежезабранная кровь мелких лабораторных животных; 9. Шпатель для растяжки мазков; *Добавлено:* **8. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ**
10	3-6	9	*Удалено:* 1. Обработать стекла. Стекла (новые и бывшие в употреблении) помещают в эмалированную посуду в 2 % раствор хозяйственного мыла или стирального порошка на 8—10 ч. Кипятят в указанном растворе 5—10 мин, старые мазки предварительно стирают ветошью или ватным тампоном. Более длительное кипячение или использование алюминиевой посуды не рекомендуют, так как стекла мутнеют. Промывают в проточной воде. Насухо вытирают и помещают в этиловый спирт на 30—60 мин. Насухо вытирают чистым полотенцем и хранят в широкогорлой чистой посуде с притертой пробкой. Чистые стекла рекомендуется брать либо пинцетом, либо за края (соприкосновение пальцев с поверхностью стекла оставляет жирные следы). *Добавлено:* Мазки высушивают на воздухе и маркируют (лучше простым карандашом). Высохший мазок должен быть равномерно тонким, желтоватого цвета, достаточной величины (располагаться на 1-1,5 см от краев, занимать почти всю длину стекла) и оканчиваться «метелочкой». Толстые (густо-розового цвета) мазки не следует использовать, так как в них морфология клеток плохо различима.
11	6-7	10	*Удалено:* **10. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:** 1. Трахтенберг И.М. Проблема нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы) / М.: Медицина, 1991. – 208 с. 2. Тугаринова В.Н., Миклашевский В.Е., Скобцева Г.Г. Лабораторное дело / М.: Медицина, 1967. – №4. С.48. 3. Diehl K, Hull R, Morton B, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Tox. 2001;21(1):15-23. PMID: 11180276. 2. Caron A, Lelong C, Bartels T, Dorchies O, Gury T, Chalier C, Benning V. Clinical and anatomic pathology effects of serial blood sampling in rat toxicology studies, using conventional or microsampling methods. Regul Toxicol Pharmacol. 2015;72(3):429–39. 4. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientifi c Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986.

Руководитель лаборатории:

«____»_____ _____ г. _____ /_____/

дата подпись расшифровка