

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ
ФГБОУ ВО КОСТРОМСКАЯ ГСХА

Кафедра внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА С ОСНОВАМИ ГЕМАТОЛОГИИ

(ОБЩАЯ ГЕМАТОЛОГИЯ)

ПРАКТИКУМ

*Для контактной и самостоятельной работы студентов, обучающихся по
специальности 36.05.01 Ветеринария, очной и заочной форм обучения*

КАРАБАЕВО
Костромская ГСХА
2021

УДК 619 : 616-071

ББК 48.61

Л 12

Составители: сотрудники Костромской ГСХА д-р биол. наук, профессор, профессор кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства *Н.А. Кочуева*, ассистент кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства *Т.Ю. Воронина*.

Рецензент: канд. ветеринар. наук, доцент, доцент кафедры эпизоотологии, паразитологии и микробиологии Костромской ГСХА *Л.П. Кучина*.

Рекомендовано методической комиссией факультета ветеринарной медицины и зоотехнии в качестве практикума для контактной и самостоятельной работы студентов, обучающихся по специальности 36.05.01 Ветеринария, очной и заочной форм обучения

Л 12 **Лабораторная диагностика с основами гематологии (Общая гематология) :** практикум / сост. Н.А. Кочуева, Т.Ю. Воронина. — Караваево : Костромская ГСХА, 2021. — 40 с. : ил. ; 20 см. — 100 экз. — Текст непосредственный.

В издании приведены методы и техника гематологических и цитологических исследований. Практикум разработан в соответствии с программой по дисциплине «Лабораторная диагностика с основами гематологии» и предназначен для студентов специальности 36.05.01 Ветеринария очной и заочной форм обучения.

УДК 619 : 616-071

ББК 48.61

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
ТЕМА 1. Правила взятия крови у животных.....	5
1.1. Получение крови	5
1.2. Стабилизация крови и консервация сыворотки крови.....	7
1.3. Получение сыворотки крови.....	8
1.4. Получение плазмы крови	8
1.5. Получение дефибринированной крови	9
1.6. Определение скорости оседания эритроцитов.....	9
ТЕМА 2. Подсчет количества форменных элементов крови	11
2.1. Определение показателей крови на гематологическом анализаторе	12
2.2. Морфологические особенности клеток крови	14
2.2.1. Подсчет эритроцитов	14
2.2.2. Подсчет лейкоцитов.....	16
ТЕМА 3. Лейкограмма периферической крови	18
3.1. Приготовление мазков крови, их фиксация и окраска.....	18
3.2. Выведение лейкоцитарной формулы	20
3.3. Видовые лейкоцитозы и лейкопении	21
3.4. Определение патологических форм клеток крови	22
ТЕМА 4. Гемоглобинометрия	23
4.1. Определение гемоглобина в крови методом Сали	23
4.2. Гемоглобинцианидный метод.....	23
4.3. Определение цветового показателя крови.....	25
4.4. Определение среднего содержания гемоглобина в эритроците.....	25
ТЕМА 5. Гемокоагуляция	26
5.1. Измерение активированного парциального тромбопластинового времени (АРТТ)	27
5.2. Измерение протромбинового времени (РТ).....	28
5.3. Измерение тромбинового времени (ТТ)	29
5.4. Измерение фибриногена по Клаусу (FIB)	30
Тестовые задания для самоподготовки	32
Список литературы	35
Приложение	36

ВВЕДЕНИЕ

Основная цель в подготовке ветеринарного врача состоит в том, чтобы дать студентам теоретические и практические знания о причинах и механизмах развития болезней системы крови, обучить методам лабораторного исследования крови, диагностике гематологических заболеваний.

Распознавание характера заболеваний кроветворной системы особенно важно на раннем этапе диагностики для определения необходимых исследований и определения тактики лечения.

Общее клиническое исследование крови (общий клинический анализ крови, ОКА), являясь одним из важнейших диагностических методов, тонко отражает реакцию кроветворных органов на воздействие на организм различных физиологических и патологических факторов. Во многих случаях оно играет большую роль в постановке диагноза, а при заболеваниях системы кроветворения ему отводится ведущая роль.

Система гемостаза – совокупность функционально-морфологических и биохимических механизмов, обеспечивающих сохранение жидкого состояния крови, предупреждение и остановку кровотечений, а также целостности кровеносных сосудов.

ТЕМА 1. ПРАВИЛА ВЗЯТИЯ КРОВИ У ЖИВОТНЫХ.

Цель занятия: овладеть техникой отбора проб крови у разных видов животных, стабилизации ее, получения сыворотки, плазмы крови и консервирования ее, получения дефибринированной крови.

Животные: крупный рогатый скот, овцы, собаки, свиньи, кролики, куры.

Материальное обеспечение: стерильные иглы для взятия крови, шприцы емкостью 2-10 мл, стерилизатор, глазные пипетки, стерильные пробирки, ножницы, флаконы с рабочими стандартными растворами (сульфата меди, цитрата натрия, оксалата натрия, трилона Б, гепарина), спирт ректификат 70%, эфир, спирт 96%, спиртовая настойка йода 5%, вата, аппарат Панченкова, резиновый жгут, центрифуга, термостат, холодильник, химические стаканы, таблицы.

1.1. Получение крови

Кровь у животных берут из крупных подкожных вен (рис.1-4):

- ◆ у крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота, лошадей, верблюдов, северных оленей – из яремной вены;
- ◆ у собак, кошек, лис, песцов – из подкожной вены предплечья, вены Сафена, бедренной вены;
- ◆ у мелких особей и молодняка – из краниальной полой вены;
- ◆ у свиней – из ушной вены, хвостовой вены, краниальной полой вены;
- ◆ у кроликов – из ушной вены, глазного синуса, вены Сафена, бедренной вены;
- ◆ морских свинок – из краниальной полой вены;
- ◆ у птицы – из гребешка, сережек, подкрыльцовой вены, мякоти ступни.



Рисунок 1 – Взятие крови у лошади из яремной вены



Рисунок 2 – Взятие крови у собаки из вены предплечья



Рисунок 3 – Взятие крови у собаки из вены сафена

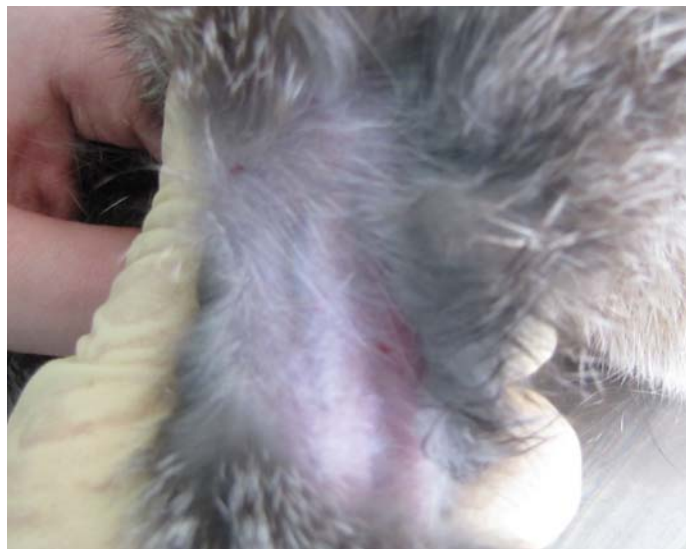


Рисунок 4 – Подготовка поля у кролика для взятия крови из вены сафена

Перед взятием крови, на месте пункции сосуда, выстригают шерсть, удаляют перо, поверхность кожи обрабатывают тампоном, смоченным 70% спиртом. Для лучшего наполнения сосудов кровью, кожу на месте пункции обрабатывают спиртово-эфирной смесью Никифорова, проводят массаж (растирание и легкое похлопывание). Ниже места пункции по ходу сосуда (шея, бедро, предплечье) для предотвращения оттока крови из сосуда, накладывают жгут. Во избежание выхода крови в подкожную клетчатку и образования гематомы, по окончании забора крови необходимо сначала расслабить жгут и только после этого извлекать иглу из вены. Если из раны продолжает выделяться кровь, место пункции необходимо обработать 96% спиртом. Чаще это явление наблюдается у свиней, когда кровь берут из хвостовой вены путем отсечения кончика хвоста. В этом случае на культю хвоста накладывают тугую повязку или резиновое кольцо, а рану обрабатывают 5% спиртовой настойкой йода.

Кровь у животных для гематологических исследований берут в три пробирки:

- Первая без стабилизатора (нативная) для получения сыворотки;
- Вторая со стабилизатором (антикоагулянтом) для проведения гематологических исследований;
- Третья с антикоагулянтом для получения плазмы и исследования системы гемостаза.

Кровь в пробирку приливают по стенке во избежание гемолиза (разрушения эритроцитов). Проба крови во второй и третьей пробирках после осторожного перемешивания жидкостей готова для исследования.

Задание 1. Освоить методику взятия крови у разных видов животных для гематологических исследований.

1.2. Стабилизация крови и консервация сыворотки крови

Для предупреждения свертывания крови (образования сгустков) ее стабилизируют, применяя антикоагулянты (вещества, предотвращающие свертываемость) из расчета:

1. 10% раствор трилона Б (ЭДТА-натриевая соль) – 4 капли на 10 мл крови;
2. 3,8 % раствор цитрата натрия (лимоннокислый натрий) – 1,5 мл или 30 мг сухого вещества на 10 мл крови;
3. 1,34% раствор натрия оксалата (щавелевокислый натрий) – 1,5 мл или 15 мг сухого вещества на 10 мл крови;
4. 0,01 мл фармакопейного раствора гепарина (5000 ЕД в 1 мл) – 50 единиц на 10 мл крови.

Кровь, стабилизированная гепарином, является наиболее приемлемой для гематологических и биохимических исследований. Из гепаринизированной крови можно готовить мазки в течение 24 часов, а подсчет форменных элементов крови производить в течение 72 часов.

С целью длительного хранения сыворотку крови и плазму подвергают консервации (вещества, предотвращающие микробное и грибковое обсеменение крови) из расчета:

1. 20% маточный раствор карболовой кислоты (лизола) из расчета – 25 мл на 1л крови, сыворотки крови – до конечной концентрации 0,5%;

2. 20% маточный раствор этакридина лактата (риванола) – 5 мл на 1 л крови, сыворотки крови, до конечной концентрации 1/1000;

3. Консервацию можно производить в установках ультрафиолетового облучения крови.

Задание 2. Освоить методику взятия крови с использованием стабилизатора у разных видов животных.

1.3. Получение сыворотки крови

Нативную кровь, (без стабилизатора) предназначенную для получения сыворотки крови, необходимо выдержать от 0,5 до 2 часов в термостате при температуре $t^{\circ}=36-37^{\circ}\text{C}$ для свертывания – образования кровяного сгустка (рис. 5). Сформировавшийся сгусток отделяем от стенки пробирки металлической спицей (делаем обводку крови). После обводки кровь помещаем в холодильник на 18-24 часа, для лучшего выхода сыворотки (ретракции – сжимания сгустка) при $t^{\circ}=2-4^{\circ}\text{C}$. После отстаивания сыворотку осторожно, чтобы не попали форменные элементы крови, сливаем в стерильную пробирку или отсасываем пипеткой.



Рисунок 5 – Сыворотка крови коровы через 2 часа после взятия

Задание 3. Освоить методику получения сыворотки крови у животного.

1.4. Получение плазмы крови

Для получения плазмы, кровь со стабилизатором центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут (рис. 6). За это время происходит осаждение форменных элементов крови, находящихся во взвешенном состоянии и крупномолекулярных фракций белка. Надосадочную часть (плазму) переносят в чистую стерильную пробирку для исследования.



Рисунок 6 – Пробирка с кровью до и после центрифугирования

Задание 4. Освоить методику получения плазмы крови у животного.

1.5. Получение дефибринированной крови

Для получения дефибринированной крови используют стерильные системы (игла, соединенная посредством шланга с флаконом в который помещены стеклянные бусы или шарики). Кровь из вены поступает во флакон. По окончании забора крови флакон подвергается постоянному встряхиванию круговыми движениями в течение 30 минут. Фибрин оседает на бусах, форменные элементы крови остаются во взвешенном состоянии. Не свернувшуюся кровь осторожно сливают, сгусток удаляют.

1.6. Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ)

Определение скорости оседания эритроцитов является одним из самых распространенных в лабораторной практике и входит в состав общего клинического анализа крови.

Ход работы. Метод Панченкова. В градуированный капилляр на 100 делений набирают до метки «Р» (деление 50) 5% раствор натрия цитрата и помещают на часовое стекло (рис. 7). Этим же капилляром дважды набирают кровь до метки «К» (деление 0) и помещают на то же стекло, смешивают растворы, не допуская образования пены. Полученную смесь набирают в капилляр до метки «К», ставят капилляр в штатив Панченкова и отмечают время начала реакции.



Рисунок 7 – Аппарат Панченкова для измерения СОЭ

Скорость оседания эритроцитов учитывают через 1 час. Измерение проводят по нижнему мениску просветлённой верхней части раствора в капилляре в миллиметрах (1 деление соответствует 1 мм).

Показатели СОЭ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Скорость оседания эритроцитов по Панченкову через 1 ч

Животные	СОЭ, мм/час
Крупный рогатый скот	0,5-1,5
Овцы	0,5-1,0
Козы	0,3-1,0
Лошади	40-70
Свиньи	2-9
Собаки	2-6
Кошки	2-6
Кролики	1-2
Куры	2-3

Диагностическое значение. У больных животных возможно изменение СОЭ (рис. 8):

- **ускорение СОЭ** – при воспалительных процессах, интоксикациях, инфаркте миокарда, анемиях, острых и хронических инфекциях (мыт, сап, чума, контагиозная плевропневмония лошадей, кровопятнистая болезнь, туберкулез и другие); инвазионных заболеваниях (пироплазмоз, нуталиоз, трипанозомоз и другие); после кровопотери, оперативных вмешательств, при злокачественных новообразованиях, гемобластозах, хроническом гепатите, циррозе печени, амилоидозе, коллагенозах.
- **замедление СОЭ** отмечается при эритремии, симптоматических эритроцитозах, переутомлении, сильном потении, полиурии, поносах, коликах, гастроэнтеритах, механической и паренхиматозной желтухах, механическом илеусе, инфекционном энцефаломиелите, стахиоботриотоксикозе и других заболеваниях, связанных с потерей воды организмом и повышением температуры тела.



Рисунок 8 – СОЭ в норме и при патологии у коров

Задание 5. Освоить методику определения СОЭ у животного. Определить СОЭ пробы крови у животного. Занести результаты в бланк анализа (приложение 1).

Контрольные вопросы:

1. Опишите способы получения крови у разных видов животных?
2. Каким образом готовят поле для пункции кровеносных сосудов?
3. Что такое антикоагулянты и консерванты?
4. Какие методы стабилизации крови вы знаете?
5. Что такое СОЭ, его нормальные показатели у разных видов животных и возможные изменения?
6. Какие факторы вызывают замедление и ускорение СОЭ?

ТЕМА 2. ПОДСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ

Подсчет количества лейкоцитов и эритроцитов входят в состав общего клинического анализа крови. Определение тромбоцитов и гематокрита – при расширенном исследовании крови.

Цель занятия: Овладеть методиками морфологических исследований крови, (подсчета количества форменных элементов - эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов).

Материальное обеспечение: стабилизированная кровь, пробирки (рис. 9), камеры Горяева, меланжеры (эритроцитарный и лейкоцитарный), микропипетки (20 мкл; 500 мкл; 1,0 мл, 10,0 мл), глазные пипетки. Микроскопы, спиртовые тампоны, изотонический (0,9%) раствор хлористого натрия, 11-клавишный счетчик для подсчета лейкоцитов, иммерсионное масло, осветители к микроскопам, окрашенные мазки крови, гематологический анализатор «Vetscan» (рис. 10).



Рисунок 9 – Пробирки с антикоагулянтом для гематологического исследования



Рисунок 10 – Гематологический автоматический ветеринарный анализатор «Vetscan» для исследования крови

2.1. Определение показателей крови на гематологическом анализаторе

Подготовка проб. Используют свежую цельную кровь, стабилизированную K_3 -EDTA или Na-EDTA. Отношение EDTA к цельной крови не должно превышать 3 мг/мл (см. рис. 9). Используют фабричные пробирки с необходимым количеством EDTA и меткой уровня необходимого наполнения кровью (высота наполнения не менее 7-8 мм). Пробу перемешивают осторожными переворачиваниями 11 раз. Нельзя встряхивать пробирку с кровью, так как это может повредить клетки крови или способствовать образованию микропузырьков, приводящие к неправильным измерениям.

Ход работы.

Прибор включают и прогревают в течение 5-ти минут.

Нажимаем кнопку Measurement/Analysis, затем кнопку *Accept* (значок проба) на экране. Программное обеспечение позволяет вводить информацию для каждой пробы. Информацию о пациенте вводим перед анализом или после измерения в меню База данных.

Выбираем кнопку PT.ID для введения информации о пациенте, враче. Кнопкой ОК и стрелками клавиатуры изменяем настройки, вводим текст или числовые значения. Нажимаем кнопку *Accept* для подтверждения ввода данных или кнопку *Cancel* – для отмены.

Снимают крышку и пробирку с образцом устанавливают в ротор проб. Нажимают кнопку *Start*. Ротор проб повернется внутрь анализатора, и игла пробоотборника отберет нужное количество пробы из пробирки. При возвращении пробоотборника в исходное положение, можно убрать пробу из адаптера ротора проб. По окончании измерения появиться экран со всеми измеренными и подсчитанными параметрами. Результаты будут автоматически сохранены в памяти устройства. Если какой-то параметр выходит за границы нормы, то данный параметр выделяется темной полосой и соответствующими значками: ниже границы нормы – рядом с ним ставиться значок (–), выше нормы – значок (+).

Диагностическое значение показателей крови, определяемых на гематологическом анализаторе (рис. 11).



Рисунок 11 – Клетки крови крупного рогатого скота

Лейкоциты:

WBC (white blood cells – белые кровяные тельца) – абсолютное содержание лейкоцитов – форменных элементов крови – отвечающих за распознавание и обезвреживание чужеродных компонентов, иммунную защиту организма от вирусов и бактерий, устранение отмирающих клеток собственного организма.

Лейкоцитарные индексы:

LYM% (lymphocytes percentage) – относительное (%) содержание лимфоцитов.

LYM (lymphocytes count) – абсолютное содержание лимфоцитов.

NEU% (neutrophils percentage) – относительное (%) содержание нейтрофилов.

NEU (neutrophils count) – абсолютное содержание нейтрофилов.

MON% (monocytes percentage) – относительное (%) содержание моноцитов.

MON (monocytes count) – абсолютное содержание моноцитов.

EOS% (eosinophils percentage) – относительное (%) содержание эозинофилов.

EOS (eosinophils count) – абсолютное содержание эозинофилов.

BAS% (basophils percentage) – относительное (%) содержание базофилов.

BAS (basophils count) – абсолютное содержание базофилов

Эритроциты:

RBC (red blood cells count – красные кровяные тельца) – абсолютное содержание эритроцитов – форменных элементов крови – содержащих гемоглобин, транспортирующих кислород и углекислый газ.

HGB (Hb, hemoglobin) – концентрация гемоглобина в цельной крови. Для анализа используют цианидный комплекс или бесцианидные реактивы (как замена токсичному цианиду). Измеряется в молях или граммах на литр или децилитр.

HCT (hematocrit) – гематокрит, часть (% = л/л) от общего объема крови, приходящаяся на форменные элементы крови. Кровь на 40—45 % состоит из форменных элементов (эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов) и на 60—65 % из плазмы. Гематокрит - это соотношение объема форменных элементов к плазме крови. Считается, что гематокрит отражает соотношение объема эритроцитов к объему плазмы крови, так как в основном эритроциты составляют объем форменных элементов крови.

Эритроцитарные индексы:

MCV (HCT/RBC) – средний объем эритроцита в кубических микрометрах (мкм) или фемтолитрах (фл). В старых анализах указывали: микроцитоз, нормоцитоз, макроцитоз.

MCH (HGB/RBC) – среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах, пропорциональное отношению «гемоглобин/количество эритроцитов». Цветной показатель крови в старых анализах: ЦП=MCH*0.03

MCHC (HGB/HCT) – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, отражает степень насыщения эритроцита гемоглобином. Снижение MCHC наблюдается при заболеваниях с нарушением синтеза гемоглобина. Тем не менее, это наиболее стабильный гематологический показатель. Любая неточность, связанная с определением гемоглобина, гематокрита, MCV, приводит к увеличению MCHC, поэтому этот параметр используется как

индикатор ошибки прибора или ошибки, допущенной при подготовке пробы к исследованию.

RDWc – (Red cell Distribution width) – «ширина распределения эритроцитов» так называемый «анизоцитоз эритроцитов» – показатель гетерогенности эритроцитов, рассчитывается как коэффициент вариации среднего объема эритроцитов.

Тромбоциты.

PLT (platelets count – кровяные пластинки) – абсолютное содержание тромбоцитов – форменных элементов крови – участвующих в гемостазе.

Тромбоцитарные индексы:

MPV (mean platelet volume) – средний объем тромбоцитов.

PDWc (platelet distribution width) – относительная широта распределения тромбоцитов по объёму, показатель гетерогенности тромбоцитов.

PCT (platelet percentage) — тромбокрит, доля (%) объёма цельной крови, занимаемую тромбоцитами.

Задание 1. Освоить методику определения показателей крови на гематологическом анализаторе. Исследовать пробу крови у животного. Занести результаты в бланк анализа (приложение 1).

2.2. Морфологические особенности клеток крови

2.2.1. Подсчет эритроцитов

Ход работы.

Пробирочный метод.

В сухую пробирку вносят 2,0 мл (2000 мкл) раствора натрия хлорида. Микропипеткой на дно пробирки помещают 0,01 мл (10 мкл) крови. Пипетку дважды промывают верхним слоем жидкости. Смесь тщательно перемешивают и выдерживают 5-7 минут.

Меланжерный метод

В эритроцитарный меланжер набирают кровь до метки «0,5», затем изотонический раствор хлористого натрия до метки «101». Получают кровь в разведении 1/200. Меланжер, удерживая в руке, переворачивают 10-15 раз до полного размешивания раствора.

Готовят к работе камеру Горяева: плотно притирают покровное стекло – до образования радужных колец по краю стекла (рис. 12).

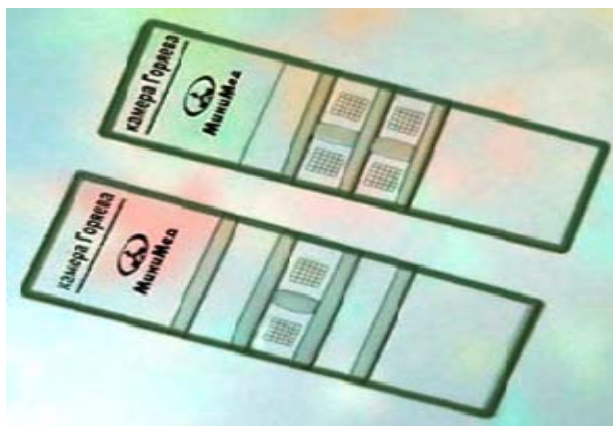


Рисунок 12 – Камера Горяева

Пробирку или меланжер встряхивают еще **2-3** раза, заряжают камеру с одной стороны: подслаивают под стекло по **1-2** капли. Камеру помещают на предметный столик микроскопа и просматривают: окуляр – **7-15**, объектив – **8**, закрытая диафрагма, опущенный конденсор (рис. 13).

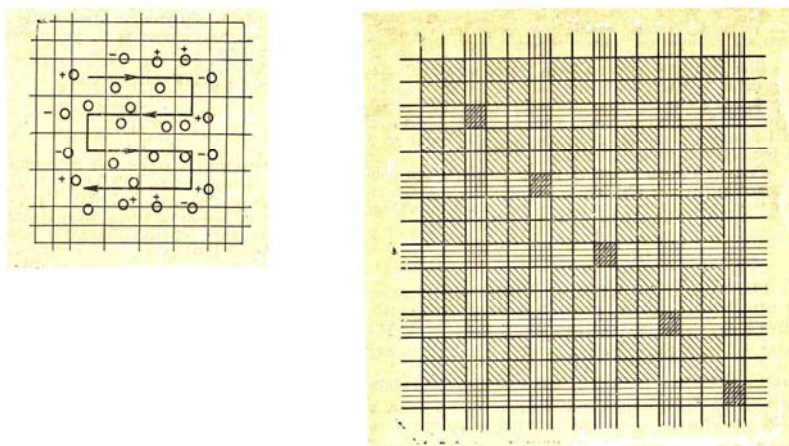


Рисунок 13 – Схема подсчета эритроцитов в камере Горяева

Эритроциты подсчитывают в **5** пакетах по **16** малых квадратов, расположенных по диагонали сетки. Результаты суммируют (рис. 14).

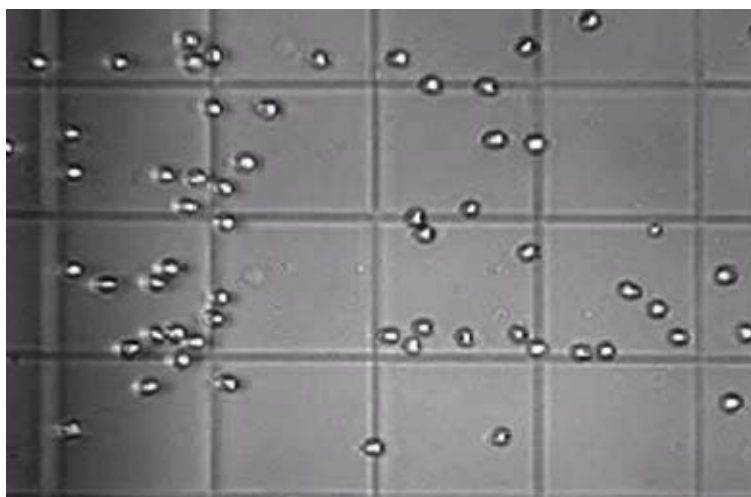


Рисунок 14 – Эритроциты в камере Горяева под микроскопом

Количество эритроцитов крови вычисляют по формуле:

$$\text{Количество эритроцитов} = \frac{E \times C}{V} = E \times 10000, \text{ где}$$

E – сумма клеток крови в 5 больших квадратах;

C – степень разведения крови; V – объем 5 больших квадратов.

В системе единиц СИ количество эритроцитов определяют в 1 литре крови, то есть полученный результат умножают на миллион и получаем $10^{12}/л$ или **Т/л** (тера на литр).

Диагностическое значение:

- **эритроцитоз** (увеличение количества эритроцитов в крови) или полицитемия, полиглобулия встречаются при потере организмом воды – (обильном потении, поносах, образовании транссудатов и экссудатов

(плевриты, перитониты, водянки). При непроходимости кишечника (механические илеусы), хронической альвеолярной эмфиземе легких, декомпенсации сердца.

- **эритроцитопения** (уменьшение количества эритроцитов в крови) или олигоцитемия наблюдается при: анемиях, инфекционных и инвазионных болезнях, интоксикациях, лейкозах, злокачественных новообразованиях, обильных кровопотерях.

Задание 2. Освоить методику определения подсчета эритроцитов в крови. Исследовать пробу крови у животного. Занести результаты в бланк анализа (приложение 1).

2.2.2. Подсчет лейкоцитов

Ход работы.

Меланжерный метод. В лейкоцитарный меланжер набирают стабилизированную кровь до метки «0,5», и до метки «11» жидкость Тюрка. Полученной смесью заряжают камеру Горяева.

Пробирочный метод. В сухую пробирку вносят 0,4 мл (400 мкл) жидкости Тюрка. Микропипеткой на дно пробирки помещают 0,02 мл (20 мкл) крови. Пипетку дважды промывают верхним слоем жидкости. Смесью тщательно перемешивают и выдерживают 5-7 минут.

Готовят к работе камеру Горяева: плотно притирают покровное стекло до образования радужных колец по краю стекла (см. рис. 13).

Пипеткой подслаивают под покровное стекло на камеру Горяева 1-2 капли раствора. Лейкоциты подсчитывают в **100** больших «пустых» квадратах сетки (см. рис 13, рис. 15).

Количество клеток высчитывают по формуле:

$$\text{Количество лейкоцитов} = \frac{E \times C}{V} = E \times 50,$$

где: E – сумма клеток крови в 100 больших квадратах

C – степень разведения крови, V – объем 100 больших квадратов

В системе СИ количество лейкоцитов определяют в 1 литре, и получаем $\times 10^9/\text{л}$ или Г/л (гига на литр).

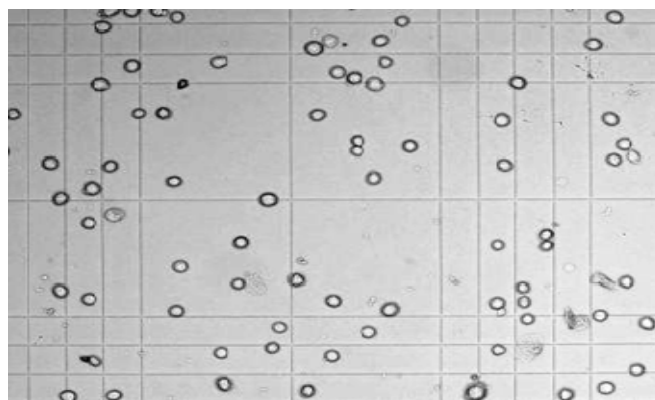


Рисунок 15 – Лейкоциты в камере Горяева под микроскопом

Количество форменных элементов в крови здоровых животных представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов в крови у взрослых здоровых животных

Животные	Кол-во эритроцитов, $10^{12}/л$	Кол-во лейкоцитов, $10^9/л$	Кол-во тромбоцитов, $10^9/л$
КРС	5,0 – 7,5	4,5 – 12,0	260 – 700
Овцы	7,0 – 12,0	6,0 – 14,0	270 – 500
Козы	12,0 – 18,0	8,0 – 17,0	300 – 900
Лошади	6,0 – 9,0	7,0 – 12,0	200 – 500
Свиньи	6,0 – 7,5	8,0 – 16,0	180 – 300
Собаки	5,2 – 8,4	8,5 – 10,5	250 – 550
Кошки	6,6 – 9,4	10,0 – 20,0	100 – 500
Кролики	4,5 – 7,5	6,5 – 9,5	125 – 250
Куры	3,0 – 4,0	20,0 – 40,0	32 – 100

Диагностическое значение:

Лейкоцитоз (повышенное число лейкоцитов в крови)

- ◆ физиологический – при беременности, у новорожденных, после приема корма, после тяжелой физической нагрузки;
- ◆ медикаментозный – после парентерального введения белковых препаратов, жаропонижающих, алкалоидов;
- ◆ патологический – при лихорадках, воспалениях, лейкозах, инфекционных болезнях;

Лейкопения – при вирусных болезнях, сальмонеллезе, стахиботриотоксикозе, лучевой болезни, истощении защитных сил организма.

Задание 3. Освоить методику определения подсчета лейкоцитов в крови. Исследовать пробу крови у животного. Занести результаты в бланк анализа (приложение 1).

Контрольные вопросы:

1. Как определить количество эритроцитов в камере Горяева?
2. Что вы понимаете под эритроцитозом и эритропенией?
3. Как провести расчет общего количества эритроцитов в крови?
4. Диагностическое значение определения эритроцитов в крови?
5. Какое количество эритроцитов в 1 мм^3 крови у различных животных?
6. Как определить количество лейкоцитов в камере Горяева?
7. Как провести расчет общего количества лейкоцитов в крови?
8. Диагностическое значение определения лейкоцитов в крови?
9. Какое количество лейкоцитов в 1 мм^3 крови у различных животных?
10. Что вы понимаете под лейкоцитозом и лейкопенией?

ТЕМА 3. ЛЕЙКОГРАММА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

3.1. Приготовление мазков крови, их фиксация и окраска

Цель занятия: овладеть методиками приготовления, фиксации и окраски мазков крови, выведение лейкоцитарной формулы (лейкограммы) и лейкоцитарного профиля, определение патологических форм клеток.

Материальное обеспечение: нативная или стабилизированная кровь, пробирки, камеры Горяева, глазные пипетки, микроскопы, предметные стекла, часы, краска Романовского-Гимза или Лейшмана, фильтровальная бумага, дистиллированная вода, спирт-эфирная смесь (по Никифорову), этиловый спирт, спиртовые тампоны, 11-клавишный счетчик для подсчета лейкоцитов, иммерсионное масло, осветители к микроскопам, окрашенные мазки крови.

Ход работы: лучше мазки готовить из свежей, нативной крови. Из цитратной или оксалатной крови мазки можно готовить в течение 6 часов после взятия, а из гепаринизированной – до 24 часов.

На подогретое предметное стекло, удерживаемое в левой руке между большим и средним пальцами за боковые грани, отступив от края на **1-1,5** см, наносят стеклянной палочкой каплю крови диаметром **2-3** мм. Правой рукой приближают шлифовальное стекло по предметному стеклу к капле крови (рис. 16). Когда капля равномерно растечется по шлифовальному стеклу, равномерным плавным движением отводят его к свободному краю предметного стекла. Получается мазок, который должен быть тонким, равномерным, без перехватов и дорожек, длинным.

Готовый мазок подсушивают на воздухе и фиксируют в течение **30** минут этиловым спиртом или **5** минут метиловым (**осторожно яд!**). Нефиксированные мазки через **1** месяц теряют способность правильно окрашиваться.

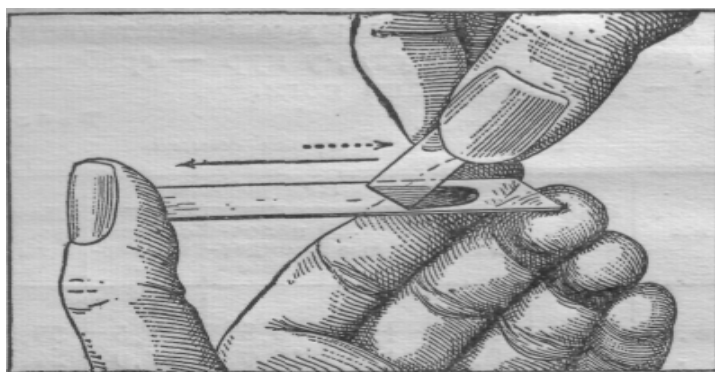


Рисунок 16 – Приготовление мазка крови

Фиксированный мазок красят в специальных кюветах или на стеклянной рамке краской Романовского-Гимза или окрашенными бумажными полосками в течение **25-30** минут (рис. 17). После чего мазки промывают дистиллированной водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

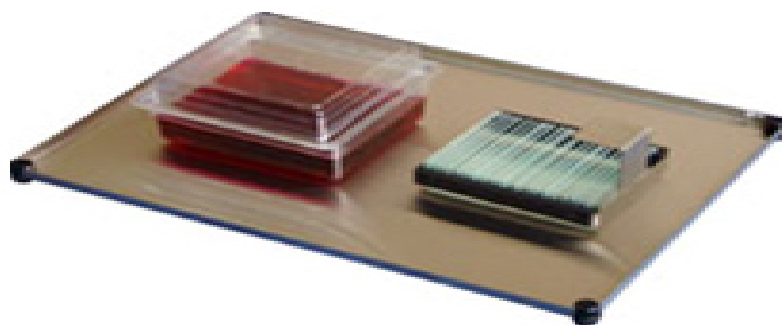


Рисунок 17 – Покраска мазков крови в специальном штативе

При использовании краски Лейшмана мазки не фиксируют, так как в состав краски входит метиловый спирт. Нефиксированные мазки помещают в кюветы с краской на 3-4 минуты, затем переносят в кювету с разбавленной краской (в соотношении 1:1 с дистиллированной водой), и красят 6-8 минут. Мазок промывают водой и высушивают на воздухе.

Окрашенные мазки крови исследуют под микроскопом, при увеличении **1200 – 1500**, окуляр на **7-15**, объектив – **90** с иммерсионным маслом.

Изучая морфологические особенности клеток крови: обращают внимание на величину, форму клеток и их ядер, характер окраски и структуру ядра, цитоплазмы, наличие включений, соотношение количества отдельных видов клеток.

Таблица 3 – Морфологические особенности лейкоцитов крупного рогатого скота

Вид лейкоцита	Размер клетки (мкм)	Форма ядра	Цитоплазма	
			Окраска	Зернистость
Базофилы	11-14	Неопределенная полиморфная	Розовая или бледно-фиолетовая	Круглые, темно-фиолетовые или вымытые, в виде вакуолей. Матовые
Эозинофилы	9-22	Округлое, вытянутое, или сегментированное	Голубая	Круглые, ярко-красные, блестящие
<u>Нейтрофилы</u> Миелоциты	9-14	Круглое, неравномерно окрашено	Бледно (голубая или розовая)	Точечная, розовая
Юные	9-14	Бобовидное или колбасовидное, неравномерно окрашено	Розовая	Мелкая, розовая
Палочко-ядерные	9-14	Вытянуто в виде изогнутой палочки	Розовая	Мелкая, розовая, плохо видна
Сегментоядерные	9-14	2-5 сегментов То же	Розовая	Мелкая, розовая, пылейдная, плохо видна

Лимфоциты	6-19	Круглое или с бухтообразным углублением	Голубая, есть просветленная перинуклеарная зона	Встречается редко, ярко-красного цвета
Моноциты	12-24	Полиморфное (в форме подковы, бабочки, с лопастьями)	Голубовато-серая, дымчатая. Нет просветленной перинуклеарной зоны	Встречается редко, пылевидная, вблизи ядра

Эритроциты – у млекопитающих имеют округлую форму (у верблюдов и лам – овальную, у птиц – овальные с ядрами). Они окрашены в розовый цвет с небольшим просветлением в центре. Диаметр эритроцитов составляет (мкм): КРС – 4,4-7,7; овцы – 3,0-5,6; козы – 2,1-4,9; лошади – 4,5-7,5; свиньи – 4,0-9,0; собаки – 4,2-10,0; куры – 9,3×5,5–12,2×7,2.

Тромбоциты – овальной, округлой или угловатой формы. Окрас неравномерный: периферическая часть (гиаломер) – голубой, центральная часть (грануломер) – фиолетовый. Диаметр клеток 1,0-4,0 мкм. У птиц – веретенообразной формы, содержат овальные ядра. В мазке тромбоциты располагаются группами по 5-6 и более пластинок.

Лейкоциты – при дифференцировке лейкоцитов обращают внимание на размер и форму клеток, ядер, окраску и наличие зернистости в цитоплазме. Морфологические особенности лейкоцитов крупного рогатого скота приведены в таблице 3.

Задание 1. Освоить методику приготовления и окраски мазков крови животного.

Контрольные вопросы:

1. Как приготовить мазки крови?
2. Какие требования предъявляются к мазку крови?
3. Как проводится окраска мазков крови по Романовскому-Гимзе?
4. Какие морфологические отличия имеют клетки крови птиц?
5. Какие морфологические отличия определяются у гранулоцитов?
6. По каким признакам отличить эозинофилы, базофилы и нейтрофилы?
7. По каким признакам дифференцировать нейтрофильные клетки разной генерации

3.2. Выведение лейкоцитарной формулы (лейкограммы)

Ход работы. При работе с мазками крови крупного рогатого скота лейкоцитарную формулу выводят двупольным методом. Для этого наносят 1-2 капли иммерсионного масла на противоположные края мазка, отступая от его начала и конца на 1-1,5 см. Отпускают иммерсионный объектив (90 кратный) в каплю масла при помощи макровинта, затем – устанавливают резкость при помощи микровинта. Перемещают мазок по предметному столику микроскопа до противоположного края мазка и отмечают все лейкоциты, которые окажутся в поле зрения. Просмотреть 3-4 поля зрения вправо от капли, вдоль края мазка и провести препарат к первоначальному краю параллельно первой линии

просмотра, где снова просматривают 3-4 поля. При просмотре мазка определяют вид каждого лейкоцита и отмечают его на **11**-клавишном счетчике. Подсчитав в сумме **50** клеток, переводят объектив на другую каплю масла и продолжают просмотр. Когда будет найдено и отмечено **100** лейкоцитов раздастся сигнал. Записывают результаты подсчета по видам лейкоцитов и отношение к сумме (процентное соотношение), выводят лейкограмму.

Если мазки приготовлены из крови лошади, свиньи или собаки, лейкограмму выводят **4**-польным методом – наносят **4** капли масла на мазок и от каждой капли считают по **25** клеток с глубиной просмотра **3-4** поля зрения. Лейкограмму выражают в процентном соотношении, и в форме относительного или абсолютного содержания лейкоцитов каждого вида в л крови вносят в таблицу (табл. 4).

Таблица 4 – Лейкограмма (% , 10⁹/л)

Всего лейкоцитов	Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы				Лимфоциты	Моноциты
			Миелоциты	Юные	Палочкоядерные	Сегментоядерные		
Найдено								
Норма								

Показатели содержания в крови животных разных видов лейкоцитов отражено таблице 5.

Таблица 5 – Лейкоцитарная формула крови животных и птиц, %

Вид животных	Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы				Лимфоциты	Моноциты
			Миелоциты	Юные	Палочкоядерные	Сегментоядерные		
КРС	0-2	3-8	-	0-1	2-5	20-35	40-75	2-7
Овцы	0-1	4-12	-	0-2	3-6	35-45	40-50	2-5
Козы	0-1	3-12	-	-	1-5	29-38	47-64	1-2
Кошки	0-1	2-6	-	0-1	3-6	45-62	25-44	2-4
Свиньи	0-1	1-4	-	0-2	2-4	40-48	40-50	2-6
Собаки	0-1	2-10	-	-	1-6	40-71	21-40	1-5
Лошади	0-1	2-8	-	0-1	3-9	40-45	36-51	1-5
Кролики	0-2	1-3	-	-	5-6	33-39	48-62	1-3
Куры	1-3	6-10	-	-	24-30	-	52-60	4-10
Гуси	1-4	3-9	-	-	30-44	-	40-56	2-6
Утки	0-5	4-12	-	-	30-42	-	42-59	2-7

3.3. Видовые лейкоцитозы и лейкопении:

Видовой лейкоцитоз может быть абсолютным и относительным, то есть с увеличением количества одного или двух видов лейкоцитов при нормальном или повышенном содержании общего количества лейкоцитов, или же вследствие перераспределения процентного соотношения видов лейкоцитов в лейкограмме.

- Нейтрофилия с простым регенеративным сдвигом ядра влево;
- Нейтрофилия с гиперрегенеративным сдвигом ядра влево;
- Нейтрофилия с дегенеративным сдвигом ядра влево;
- Нейтрофилия со сдвигом ядра вправо;
- Нейтропения
- Лимфоцитоз
- Лимфоцитопения
- Эозинофилия
- Эозинопения
- Моноцитоз
- Моноцитопения
- Базофилия

3.4. Определение патологических форм клеток крови

В мазке крови могут встречаться молодые (незрелые) клетки крови. Они указывают на нарушение функции кроветворных органов: лимфобласты, монобласты, миелобласты, ретикулярные клетки, мегакариоциты, атипичные клетки, патологические формы эритроцитов – анизоциты, пойкилоциты, анизохромциты, ядродержащие формы, клетки с включениями (тельца Жолли, кольца Кебота и другие); одиночное расположение тромбоцитов или наличие у них гигантских форм, вакуолей, уменьшение или отсутствие грануломеров и другие.

Возможные изменения лейкоцитов, указывающие на патологический процесс разной степени выраженности:

◆ Нейтрофилы – токсигенная зернистость, вакуолизация цитоплазмы и ядра, пикноз (сморщивание) ядра, кариорексис (разрыв ядра), полисегментация ядра (более 5-ти сегментов), набухание ядер, потеря связи между сегментами ядра, анизоцитоз и другие.

◆ Лимфоциты – двуядерные клетки, клетки Ридера (рассеченное ядро), митоз ядра, тени Боткина-Гумпрехта, клетки Тюрка (неправильной формы), наличие вакуолей, перинуклеарной зоны.

◆ Эозинофилы – гиперсегментация ядра, овальные гранулы в цитоплазме, изменение окраски.

◆ Моноциты – анизоцитоз, разрыхление ядра, вакуолизация и изменение цвета цитоплазмы.

Задание 2. Освоить методику определения лейкограммы крови. Посчитать лейкоцитарную формулу крови у животного. Занести результаты в бланк анализа (приложение 1).

Контрольные вопросы.

1. Диагностическое значение лейкоцитарной формулы?
2. Как проводят подсчет форменных элементов крови?
3. Что такое лейкоформула и лейкоцитарный профиль?
4. Перечислить патологические формы клеток крови.
5. Дать характеристику видовым лейкоцитозам и лейкопениям.
6. Клинико-диагностическое значение изучения морфологии крови.

ТЕМА 4. ГЕМОГЛОБИНОМЕТРИЯ

Гемоглобин – основной дыхательный пигмент эритроцитов, относящийся к хромопротеидам и обеспечивающий ткани кислородом.

Гемоглобин в крови определяется различными методами – по Сали, гемоглобинцианидный метод, диакомгем, эритрогемометрами.

Цель занятия. Освоить методики исследования гемоглобина животных. Научиться определять цветовой показатель крови, среднее содержание гемоглобина в эритроците (СГЭ).

Материальное обеспечение. Нативная или стабилизированная кровь, гемометр Сали, 0,1 н раствор соляной кислоты, дистиллированная вода, глазные пипетки; диагностический набор реагентов для определения гемоглобина в крови гемоглобинцианидным методом.

4.1. Определение гемоглобина в крови методом Сали

Ход работы. В градуированную пробирку гемометра вносят 0,1 н раствор соляной кислоты до нижней метки (2 г%). Пипеткой набирают 0,02 мл крови (до метки), и помещают в пробирку под кислоту. Растворы в пробирке смешивают стеклянной палочкой до получения однородной суспензии. Образуется соляно кислый гематин. Уравнивают цвет суспензии, разводя ее дистиллированной водой со стандартными растворами. По верхнему мениску раствора считывают показатель количества гемоглобина (г%). При пересчете в системе СИ (г/л) результаты умножаем на 10.

4.2. Гемоглобинцианидный метод

Гемоглобинцианидный метод предназначен для количественного определения содержания гемоглобина в крови (метод Drabkin).

Принцип метода. Гемоглобин крови при взаимодействии с железосинеродистым калием окисляется в метгемоглобин (гемиглобин), образующий с ацетонциангидрином гемоглобинцианид, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации гемоглобина в крови и измеряется фотометрически при длине волны 540 (500-560) нм (рис. 18).



Рисунок 18 – Полуавтоматический биохимический анализатор Stat Fax

Ход работы.

В пробирки внести кровь и реактивы согласно указаниям в таблице 6.

Таблица 6 – Проведение анализа определения гемоглобина

	Опыт, мл	Контроль, мл	Бланк, мл
Трансформирующий раствор	2,5	2,5	2,5
Кровь	0,01	–	–
Калибровочный раствор	–	0,01	–

Перемешать, инкубация 20 минут при T=+18-25°C

Измеряют величину оптической плотности опытных проб на биохимическом анализаторе или фотоколориметре против холостой пробы (трансформирующего раствора) при длине волны 540 (500-560) нм.

Концентрация гемоглобина рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{E_o}{E_k} \cdot 120, \text{ где}$$

C – концентрация гемоглобина в опытной пробе, г/л;

E_o – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

E_k – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

120 – концентрация гемоглобина в калибровочном растворе, г/л

Показатели гемоглобина в крови животных приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Показатели гемоглобина в крови животных (г/л)

Животные	Гемоглобин, г/л	Цветовой показатель	СГЭ (пг; 10^{-12} г)
Крупный рогатый скот	99-129	0,7-1,1	16,5-18,5
Овцы	90-133	0,5-0,7	10,0-13,0
Козы	100-150		
Лошади	80-140	0,8-1,2	17,0-20,0
Свиньи	90-110	0,8-1,0	16,0-19,0
Собаки	110-170	0,8-1,2	19,0-23,0
Кошки	100-140	0,7-1,1	17,0-20,0
Кролики	105-125	0,8-1,0	21,0-23,0
Куры	80-120	2,0-3,0	36,0-40,0

Диагностическое значение.

♦ Снижение количества гемоглобина (*олигохромемия*) отмечаем при нарушении минерального обмена веществ, авитаминозах, анемиях.

♦ Увеличение количества гемоглобина (*гиперхромемия*) при поносах, рвоте, потливости, образовании транссудатов и экссудатов, миоглобинурии, эмфиземе легких, миелопролиферативных заболеваниях.

Задание 1. Освоить методику определения гемоглобина крови. Определить количество гемоглобина в крови у животного. Занести результаты в бланк анализа (приложение 1).

4.3. Определение цветового показателя крови

Цветовой показатель крови отражает относительное содержание гемоглобина в эритроците гемоглобином одного среднего эритроцита.

Цель работы: Вычислить цветовой показатель крови.

Ход работы: Цветовой показатель вычисляют по формуле:

$$ЦП = \frac{Hb_{пр} \times E_n}{Hb_n \times E_{пр}}, \text{ где}$$

ЦП – цветовой показатель;

Hb_н – среднее количество гемоглобина в норме;

Hb_{пр} – количество гемоглобина в исследуемой пробе;

E_н – среднее количество эритроцитов в норме;

E_{пр} – количество эритроцитов в исследуемой пробе.

Значения цветового показателя крови животных см. в таблице 7.

Диагностическое значение. Отклонение цветного показателя на 15% от нормы свидетельствует о нарушении состава крови и выражается повышением (*гиперхромемия*) – при гемолитических анемиях, или понижением (*гипохромемия*) – при постгеморрагических анемиях.

Задание 2. Освоить методику определения ЦП крови. Определить ЦП крови у животного. Занести результаты в бланк анализа (приложение 1).

4.4. Определение среднего содержания гемоглобина в эритроците (СГЭ)

Показатель СГЭ отражает абсолютное содержание гемоглобина в одном эритроците в пикограммах (пг). 1 пикограмм=1 пг=1 10⁻¹² г

$$СГЭ \text{ (пг)} = \frac{Hb_{пр}}{E}, \text{ где}$$

Hb_{пр} – количество гемоглобина в исследуемой пробе,

E_{пр} – количество эритроцитов в исследуемой пробе

Диагностическое значение. Снижение СГЭ отражает гипохромию и наблюдается при железодефицитных анемиях, повышение имеет место при макроцитарных и мегалоцитарных анемиях.

Задание 3. Освоить методику определения СГЭ крови. Определить СГЭ крови у животного. Занести результаты в бланк анализа (приложение 1).

Контрольные вопросы:

1. Как определить количество гемоглобина по методу Сали?
2. Диагностическое значение определения гемоглобина?
3. Сколько содержится гемоглобина в крови у разных видов животных?
4. Как определить цветной показатель?
5. Какое диагностическое значение определения цветного показателя и среднего содержания гемоглобина в эритроците?
6. Что такое нормо-, гипо- и гиперхромия?

ТЕМА 5. ГЕМОКОАГУЛЯЦИЯ

Цель занятия: Овладеть методиками измерения показателей гемокоагуляции.

Материальное обеспечение: четырехканальный гемокоагулометр фирмы «Solar» (рис. 19), магнитные якоря (рис. 20), кровь нативная, плазма крови, пробирки стеклянные, центрифуга лабораторная, пробирки, микропипетки на 0,1, 0,2, 0,25, 1,0, 2,0 мл, вода дистиллированная, спиртовые тампоны, 0,9% физиологический раствор натрия хлорида, пластиковые или силиконовые пробирки, содержащие 3,8% раствор цитрата натрия, диагностические наборы определения протромбинового времени, тромбинового времени, активированного, парциального тромбoplastинового времени, фибриногена (рис. 21-24), перчатки резиновые хирургические.



Рисунок 19 – Гемокоагулометр четырехканальный СТ 2410



Рисунок 20 – Магнитные якоря для коагулологии

Преаналитический этап. Кровь для исследования забирают из вены в пластиковую или силиконовую пробирку, содержащую 3,8% раствор цитрата натрия, соотношение объемов крови и цитрата натрия – 9:1. Кровь центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. Полученную бедную тромбоцитами плазму переносят в стеклянную пробирку. Центрифугирование проводят непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы – сразу после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы, имеющих сгустки, гемолиз, избыток цитрата натрия и полученной более 2 ч назад, а также замороженной плазмы крови.

Измерение показателей гемокоагуляции проводят с помощью диагностических наборов на гемокоагулометре: прогреть прибор 30 минут. На дисплее выбрать режим «Измерение», исследуемый показатель, измерение плазмы. Выдержать кюветы с магнитными якорями в течение 2-х мин во встроенном блоке подготовки проб.

5.1. Измерение активированного парциального тромбопластинового времени (АРТТ, АПТВ)


Изучение активированного парциального тромбопластинового времени является базовой методикой исследования системы гемостаза (оценка первой фазы плазменного гемостаза).

Принцип метода. Определяется время свертывания плазмы крови в условиях стандартизированной контактной (каолином) и фосфолипидной (кефалином) активации процесса в присутствии ионов кальция.



Рисунок 21 – Набор реагентов для определения активированного парциального тромбопластинового времени

Ход работы.

1. Внести в каждую кювету 0,1 мл (100 мкл) плазмы и 0,1 мл (100 мкл) кефалин-каолиновой смеси и установить в кюветное отделение
2. Кнопкой  включить отсчет инкубирования.
3. Индикация «Старт»
4. Добавить 0,1 мл (100 мкл) прогретого рабочего раствора хлорида кальция (37°C) через втулку прибора
5. Провести измерение пробы
6. Снять показатели по дисплею прибора: АРТТ ... с, R= показатель отношения АРТТ плазмы пробы / АРТТ плазмы контроля

Диагностическое значение. Нормативные показатели АПТВ составляют 28-40 с (табл. 8-9). Определение АПТВ используется для выявления гипер- и гипокоагуляционного сдвига, контроля за гепаринотерапией при тромбозах, тромбоэмболиях и ДВС-синдромах различной этиологии, для диагностики гемофилии (дефицит факторов VIII, IX, XI). Удлинение АПТВ наблюдается при врожденной недостаточности факторов свертывания крови (за исключением факторов VII и XIII), наличие в крови ингибиторов свертывания (в частности, при лечении гепарином), диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови и фибринолизе. Укорочение АПТВ указывает на гиперкоагуляцию и рассматривается как фактор риска тромбозов.

Таблица 8. Показатели коагуляционного гемостаза у животных

Животные	АЧТВ(сек)	ПВ (сек)	ТВ (сек)	Фибриноген, г/л
Крупный рогатый скот	11-17,4	6,8-8,4	4,3-7,1	
Телята	39,4-40	17,6-19,05	16,9-17,3	3,12-3,3
Лошади	12,3-16,7	8,7-10,5	5,6-9,0	–
Собаки	11-16	11-20	9-20	2-4
Кошки	9-19	11-20	9-20	1,5-4

Таблица 9 – Показания основных коагуляционных тестов при дефиците различных факторов свертывания крови (по Назаренко Г.И, Кишкун А.А., 2005)

Дефицит факторов и эффекты	Замедление свертывания		
	АЧТВ	протромбиновый	тромбиновый тест
V	+	+	-
VII	-	+	-
VIII	+	-	-
IX	+	-	-
X	+	+	-
XI	+	-	-
XII	+	-	-
XIII	-	-	-
Прекалликреин	+	-	-
ВМ кининоген	+	-	-
Фактор Виллебранда	Часто +	-	-
Гепарин	+	+	+
Кумарины	+	+	-

Задание 1. Освоить методику определения АПТВ крови. Определить АПТВ крови у животного. Занести результаты в бланк анализа (приложение 1).

5.2. Измерение протромбинового времени (РТ)

Определение протромбинового времени используется для тестирования факторов протромбинового комплекса (II-протромбина, V, VII, X) и контроля за лечением антикоагулянтами непрямого действия (Оценка второй фазы плазменного гемостаза).

Принцип метода. Тромбопластин (фактор III, тромбокиназа) превращает протромбин плазмы крови в присутствии ионов кальция в активный фермент тромбин, трансформирующий фибриноген плазмы крови в нерастворимый фибрин. Измеряется протромбиновое время – время образования фибрина в плазме крови в присутствии ионов кальция и тромбопластина.



Рисунок 22 – Набор реагентов для исследования протромбинового времени

Ход работы.

1. Внести в каждую кювету 0,1 мл (100 мкл) плазмы и установить в кюветное отделение
2. Кнопкой ⊕ включить отсчет инкубирования.
3. Индикация «Старт»
4. Добавить 0,2 мл (200 мкл) прогретой тромбопластин-кальциевой смеси (37°С) через втулку прибора
5. Провести измерение пробы
6. Снять показатели по дисплею прибора: РТ ... с, показатель по Квику (в норме – >60%), INR (МИЧ) (по паспорту), FIB – сек
7. Вычислить ПО (протромбиновое отношение) = ПВ больного /ПВ контр.плазмы x К, где К – (нормализованный коэффициент, указан в паспорте набора)
8. Определить МНО=ПО^{МИЧ} (по таблице)

Диагностическое значение. В норме ПО= 0,9-1,3. Нормальное МНО близко к **1,0**. Чем выше МНО, тем значительнее полученная гипокоагуляция и тем чаще и опаснее геморрагические осложнения.

Удлинение РТ наблюдается при врожденной или приобретенной недостаточности факторов, отражающих функционирование внешнего механизма образования протомбокиназы, ее действие на протромбин и последующее образование фибрина (факторов X, VII, V, II, I), при приеме антикоагулянтов, тяжелых поражениях печени и недостаточности витамина К (механическая желтуха, нарушение всасывания в кишечнике, кишечный дисбактериоз). Терапия непрямыми антикоагулянтами считается адекватной, если протромбиновое время увеличивается примерно в 2 раза.

Задание 2. Освоить методику определения РТ крови. Определить РТ крови у животного. Занести результаты в бланк анализа (приложение 1).

5.3. Измерение тромбинового времени (ТТ)

Определение тромбинового времени используется при диагностике нарушений конечного этапа свертывания (оценка третьей фазы плазменного гемостаза).

Принцип метода. Заключается в определении времени свертывания плазмы крови под влиянием тромбина стандартной активности.



Рисунок 23 – Набор реагентов для исследования тромбинового времени

Ход работы.

1. Внести в каждую кювету 0,1 мл (100 мкл) плазмы и установить в кюветное отделение
2. Кнопкой \odot включить отсчет инкубирования.
3. Индикация «Старт»
4. Добавить 0,1 мл (100 мкл) прогретого рабочего раствора тромбина (37°C) через втулку прибора
5. Провести измерение пробы
6. Снять показатели по дисплею прибора: ТТ ... с, R=показатель отношения ТТ плазмы пробы / ТТ плазмы контроля

Диагностическое значение. В норме ТТ в плазме составляет 14-17 с (см.табл. 8-9). Укорочение ТТ свидетельствует о гиперфибриногенемии. Удлинение ТТ бывает при присутствии в крови быстродействующих антикоагулянтов (гепарин и др.), образовании и накоплении в кровотоке продуктов деградации фибриногена/фибрина, обладающих антитромбиновой активностью, гипофибриногенемии, дисфибриногенемии, ДВС крови, остром фибринолизе, тяжелых поражениях печени и наличии в крови ингибиторов тромбина. Полная несвертываемость плазмы под влиянием тромбина наблюдается сразу после внутривенного введения терапевтических доз (5000-10000 ед.) гепарина.

Задание 3. Освоить методику определения ТТ крови. Определить ТТ крови у животного. Занести результаты в бланк анализа (приложение 1).

5.4. Измерение фибриногена по Клаусу (FIB)

Хронометрический метод по Клаусу предназначен для быстрого количественного определения содержания фибриногена в плазме крови (оценка третьей фазы плазменного гемостаза).

Принцип метода. Заключается в определении времени свертывания разбавленной цитратной плазмы избытком тромбина. Время свертывания при этом пропорционально концентрации фибриноген.



Рисунок 24 – Набор реагентов для определения фибриногена

Ход работы.

1. Развести плазму: 0,1 мл плазмы+0,9 мл рабочего раствора трис–буфера.
2. Внести в кювету 0,2 мл (200 мкл) разведенной плазмы и установить в кюветное отделение
3. Кнопкой ⊕ включить отсчет инкубирования – 1 минута
4. Индикация «Старт»
5. Добавить 0,1 мл (100 мкл) прогретого рабочего раствора тромбина (18-25-37°С) (встроенный блок А1 или А2) через втулку прибора
6. Провести измерение пробы
7. Снять показатели по дисплею прибора: FIB ... время свертывания в сек и концентрации фибриногена в г/л.

Диагностическое значение. Нормативные значения фибриногена 3-4 г/л (см.табл. 8). Уменьшение концентрации фибриногена наблюдается при его врожденной недостаточности, тяжелых заболеваниях печени, диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови, остром фибринолизе. Увеличение концентрации фибриногена отмечается при инфекционных заболеваниях, хронических воспалительных процессах, злокачественных новообразованиях, тромбозах и тромбоэмболиях, во время беременности, после травм, родов и операций.

Задание 4. Освоить методику определения фибриногена крови. Определить фибриногена крови у животного. Занести результаты в бланк анализа (приложение 1).

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1. Верное соотношение 5% раствора цитрата натрия и крови для определения СОЭ – это:
 - А) 1:3
 - Б) 1:10
 - В) 1:5
 - Г) 1:4
2. В штативе Панченкова капилляры располагаются:
 - А) строго горизонтально
 - Б) под углом 45°
 - В) под углом 90°
 - Г) с наклоном влево
3. Цветной показатель – это:
 - А) соотношение эритроцитов и лейкоцитов в 1 л крови
 - Б) степень насыщенности эритроцитов гемоглобином
 - В) количество гемоглобина в 1 л крови
 - Г) соотношение эритроцитов и гемоглобина плазмы
4. Для определения гемоглобина необходимо иметь:
 - А) капилляр Панченкова
 - Б) штатив Панченкова
 - В) биохимический анализатор
 - Г) камеру Горяева
5. Если цветной показатель 0,89, то это:
 - А) гипохромия
 - Б) гиперхромия
 - В) нормохромия
 - Г) анемия
6. Единицы измерения СОЭ:
 - А) г/л
 - Б) кол-во эритроцитов в 1 л крови
 - В) мм/ч
 - Г) г%
7. СОЭ определяют по высоте столбика:
 - А) эритроцитов
 - Б) фибрина
 - В) плазмы
 - Г) лейкоцитов
8. Мазок крови окрашивается по Романовскому для:
 - А) подсчета лейкоцитов в 1 л крови
 - Б) подсчета эритроцитов в 1 л крови
 - В) подсчета ретикулоцитов и тромбоцитов
 - Г) подсчета лейкоцитарной формулы
9. При взятии крови стерильными могут не быть:
 - А) капилляры Панченкова
 - Б) штатив Панченкова
 - В) скарификаторы
 - Г) вата

10. При попадании биологического материала (крови) на кожу надо немедленно:
- А) обработать тампоном с перекисью и промыть водой с мылом
 - Б) обработать тампоном со спиртом, потом промыть водой с мылом
 - В) обработать тампоном с 3% р-ром хлорамина 2 мин, потом промыть водой с мылом
 - Г) промыть водой с мылом
11. В бланках гематологических анализаторов WBC означает
- А) абсолютное число нейтрофилов в крови
 - Б) абсолютное число моноцитов в крови
 - В) относительное число моноцитов в крови
 - Г) общее количество лейкоцитов в 1 л крови
12. В бланках гематологических анализаторов RBC означает
- А) общее количество эритроцитов в 1 л крови
 - Б) концентрация гемоглобина в г/л
 - В) показатель гематокрита
 - Г) индекс морфологии эритроцитов
13. В бланках гематологических анализаторов HGB означает
- А) концентрация гемоглобина в г/л
 - Б) общее число эритроцитов в 1 л крови
 - В) показатель гематокрита
 - Г) индекс морфологии эритроцитов
14. Коагулограмма - это:
- А) метод измерения времени свертывания
 - Б) система представлений о свертывании
 - В) комплекс методов для характеристики разных звеньев гемостаза
 - Г) учение о кроветворении
15. Определение тромбинового времени используется для:
- А) определение фибринообразования
 - Б) контроля за непрямыми антикоагулянтами
 - В) наблюдение за гепаринотерапией
 - Г) диагностики дисфибриногенемии
16. Достоверная информация об эритроцитах:
- А) безъядерная клетка, имеющая форму двояковогнутого диска;
 - Б) продолжительность жизни 5-6 месяцев;
 - В) продолжительность жизни 60–80 дней;
 - Г) синтезирует 30% от общего количества гемоглобина в клетке.
17. Кровь для проведения общеклинического анализа берут у животного
- А) до приема пищи
 - Б) после приема пищи
 - В) после физической нагрузки
 - Г) после приема лекарственных препаратов

18. Для разведения крови, при подсчете эритроцитов в камере Горяева, используют

- А) 3 % раствор уксусной кислоты
- Б) 0,9 % раствор натрия хлорида
- В) 10 % раствор натрия хлорида
- Г) 0,5 % раствор трилона Б

19. Большой квадрат сетки Горяева разделен на:

- А) 225 малых квадратов
- Б) 100 малых квадратов
- В) 20 малых квадратов
- Г) 16 малых квадратов

20. К агранулоцитам относятся

- А) нейтрофилы
- Б) эозинофилы
- В) моноциты
- Г) базофилы

Ответы к тестовым заданиям:

1 – Г; 2 – В; 3 – Б; 4 – В; 5 – В; 6 – В; 7 – В; 8 – Г; 9 – Б; 10 – Б;
11 – Г; 12 – А; 13 – А; 14 – В; 15 – В; 16 – А; 17 – А; 18 – Б; 19 – Г; 20 – В.

Список литературы

1. Беспятых, О.Ю. Физиология системы крови: / О.Ю. Беспятых, Е.В. Овечкина. Вятская ГСХА. Каф. физиологии и биохимии. – 2-е изд. перераб. и доп. – Киров : ВГСХА, 2009. – 87 с.
2. Васильев, Ю.Г. Ветеринарная клиническая гематология [Электронный ресурс] : учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по направлениям подготовки (специальности) "Ветеринария" / Ю. Г. Васильев, Е. И. Трошин, А. И. Любимов. - Электрон. дан. - СПб. : Лань, 2015. - 656 с. : ил. - (Учебник для вузов. Специальная литература). - Режим доступа: <http://e.lanbook.com/reader/book/60226/>, требуется регистрация. - Загл. с экрана. - Яз. рус. - ISBN 978-5-8114-1811-4.
3. Ветеринарная пропедевтика/ Б. В. Уша, И. М. Беляков. – М.: КолосС, 2008. – 527 с.
4. Внутренние болезни животных [Электронный ресурс] : учебник для вузов / Щербаков Г.Г., ред. - Электрон. дан. - СПб. : Лань, 2018. - 720 с. : ил. (+ вклейка, 4 с.). - (Учебник для вузов. Специальная литература). - Режим доступа: <https://e.lanbook.com/reader/book/106895/#4>, требуется регистрация. - Загл. с экрана. - ISBN 978-5-8114-1682-0.
5. Гематология : учебник / Ю. Г. Васильев [и др.]. - Санкт-Петербург : Лань, 2020. - 464 с. : вклейка (8 с.). - ISBN 978-5-8114-5204-0. - Текст: электронный. - URL: <https://e.lanbook.com/reader/book/145849/#2>. - Режим доступа: для зарегистрир. пользователей.
6. Иванов, А.А. Клиническая лабораторная диагностика [Электронный ресурс] : учеб. пособие для вузов / А. А. Иванов. - Электрон. дан. - СПб. : Лань, 2017. - 432 с. : ил. - (Учебники для вузов. Специальная литература). - Режим доступа: <https://e.lanbook.com/reader/book/91073/>, требуется регистрация. - Загл. с экрана. - Яз. рус.
7. Конопатов, Ю.В. Биохимия животных [Текст] : учеб. пособие для вузов / Ю. В. Конопатов, С. В. Васильева. - СПб. : Лань, 2015. - 384 с. : ил. - (Учебники для вузов. Специальная литература). - ISBN 978-5-8114-1823-7. - к116 : 850-08.
8. Клиническая диагностика внутренних незаразных болезней животных / Б.В. Уша, И.М. Беляков, Р.П. Пушкарев. – М.: КолосС, 2003. – 487с.
9. Лабораторная диагностика/ Е.Н. Бурмистров. – М.: 2010. –167 с.
10. Методы диагностики болезней сельскохозяйственных животных [Электронный ресурс] : учебное пособие / Курдеко А.П. ; Ковалев С.П., ред. - Электрон. дан. - Санкт-Петербург : Лань, 2018. - 208 с. : ил. - (Учебники для вузов. Специальная литература). - Режим доступа: <https://e.lanbook.com/reader/book/107294/#2>, требуется регистрация. - Загл. с экрана. - Яз. рус. - ISBN 978-5-8114-2994-3.
11. Назаренко, Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований./ Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун. М.: ОАО «Издательство “Медицина“», 2005. – 541 с.

12. Патологическая физиология: учебник для вузов/ А.Г. Савойский, В.Н. Байматов, В.М. Мешков. – М : КолосС, 2008. – 541 с.
13. Риган, В.Д. Атлас ветеринарной гематологии/ В.Д. Риган, Т.Г. Сандерс; Пер. с англ. – М : Аквариум-Принт, 2008. – 136 с.
14. Руководство к практическим занятиям по внутренним незаразным болезням [Электронный ресурс] : учебное пособие для вузов / А. В. Яшин [и др.]. - 2-е изд., стер. - Электрон. дан. - Санкт-Петербург : Лань, 2019. - 172 с. : ил. - (Учебник для вузов. Специальная литература). - Режим доступа: <https://e.lanbook.com/reader/book/112066/#4>, требуется регистрация. - Загл. с экрана. - ISBN 978-5-8114-1957-9.
15. Физиология животных и этология: Учеб. пособие для вузов/ М: КолосС, 2009. – 720 с.
16. Физиология крови и кровообращения [Электронный ресурс] : учеб. пособие для вузов / Медведев И.Н., ред. - Электрон. дан. - СПб. : Лань, 2015. - 176 с. : ил. - (Учебник для вузов. Специальная литература). - Режим доступа: <http://e.lanbook.com/reader/book/60047/>, требуется регистрация. - Загл. с экрана. - Яз. рус. - ISBN 978-5-8114-1823-7.

ВЕТЕРИНАРНАЯ КЛИНИКА

Владелец _____
 Проживающий по адресу _____
 Животное: вид _____
 Порода _____ возраст _____
 Дата взятия материала _____
 Дата исследования _____

АНАЛИЗ КРОВИ

Показатель	Содержание в крови	Норма
СОЭ, мм/час		
Гемоглобин, г/л		
Эритроциты, $10^{12}/л$		
Цветной показатель (ЦП)		
СГЭ		
Лейкоциты, $10^9/л$		
Лейкограмма (%): Базофилы		
Эозинофилы		
Нейтрофилы: Миелоциты		
Юные		
Палочкоядерные		
Сегментоядерные		
Лимфоциты		
Моноциты		
Тромбоциты, $10^9/л$		
Гематокрит, %		
АПТВ, сек		
Протромбиновое время, сек		
Тромбиновое время, сек		
Фибриноген, г/л		

Ветеринарный врач _____

Учебно-практическое издание

Лабораторная диагностика с основами гематологии (Общая гематология) :
практикум / сост. Н.А. Кочуева, Т.Ю. Воронина. — Караваево : Костромская ГСХА,
2021. — 40 с. : ил. ; 20 см. — 100 экз. — Текст непосредственный.

Практикум издаётся в авторской редакции

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования "Костромская государственная сельскохозяйственная академия"
156530, Костромская обл., Костромской район, пос. Караваево, уч. городок, д. 34

Компьютерный набор. Подписано в печать 01/06/2021. Заказ № 359.
Формат 60x84/16. Тираж 100 экз. Усл. печ. л. 2,4. Бумага офсетная.
Отпечатано 01/06/2021. Цена 39,00 руб.

Вид издания: первичное (электронная версия)
(редакция от 14.05.2021 № 359)

Отпечатано с готовых оригинал-макетов в академической типографии
на цифровом дубликаторе. Качество соответствует предоставленным
оригиналам.

(Электронная версия издания - I:\подразделения \рио\издания\2021\359.pdf)



2021*359

Цена 39,00 руб.

ФГБОУ ВО КОСТРОМСКАЯ ГСХА



2021*359

(Электронная версия издания - I:\подразделения \рио\издания\2021\359.pdf)