



Центрифугирование

*К.б.н. Белоновская
Ольга Степановна*



Нормативная документация

- ГОСТ Р ИСО 15189-2015 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности»
- Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53079.4—2008. «Технологии медицинские лабораторные. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4 Правила ведения преаналитического этапа». Введен в действие с 1.01.2010 года.
- ГОСТ Р ИСО 6710-2009 «Контейнеры одноразовые для сбора образцов венозной крови»
- Приказ Департамента здравоохранения г. Москвы от 25.05.2012 N 481(ред. от 21.06.2012)"О мерах по дальнейшему совершенствованию проведения лабораторных исследований населению города Москвы» (п.п 1.6., 1.7 и п.11 Положения о ЦКДЛ – обеспечения медперсонала ЛПУ Правилами преаналитики – памятки сбора материала).

Нормативная документация

- ГОСТ Р ИСО 15190-2007 Лаборатории медицинские. Требования к безопасности.
- Методические рекомендации «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований крови», А.А. Кишкун и соав.. Одобрены на заседании профильной комиссии Минздрава России по клинической лабораторной диагностике Москва, 30 мая 2013 г.
- Методические рекомендации «Долабораторная часть преаналитического этапа клинико-лабораторных исследований», Р. Г. Скворцова, И.А. Мирошниченко, В.В. Кузьменко. Утверждены Методическим советом ИГИУВа, Иркутск, 2010

Лабораторная центрифуга – это устройство, которое эксплуатируется в медицинской и научной практике ежедневно.

Главная задача данного прибора заключается в разделении веществ по плотности и консистенции при помощи центробежной силы.

Так, вещества, обладающие максимальной плотностью, помещаются в периферию, а фракции, обладающие минимальной плотностью, становятся ближе к оси вращения.

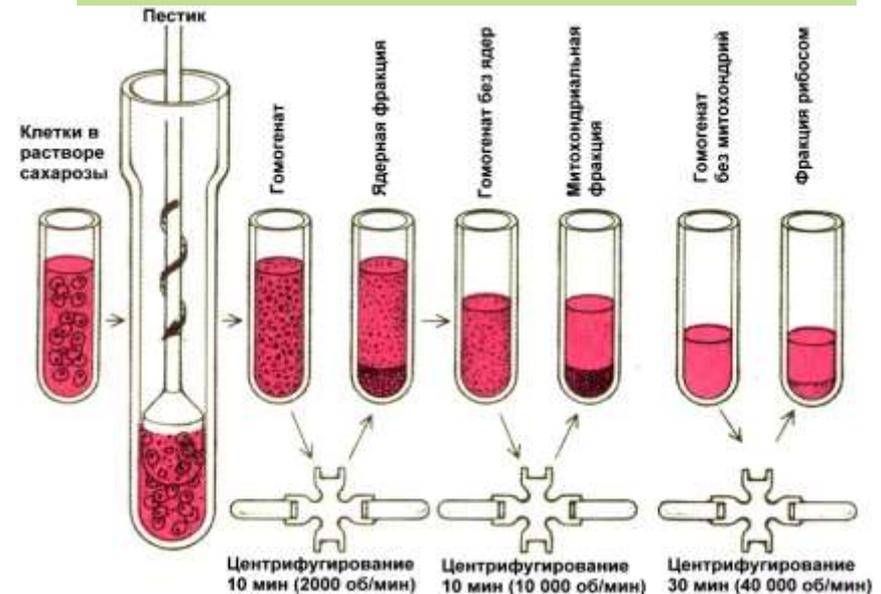


Центрифугирование – это процесс работы центрифуги.

Он основан на законе физики о центробежной силе и позволяет максимально быстро разложить жидкости на составляющие, что невозможно, например, при отстаивании, фильтрации или отжиме.

Чем больше скорость вращения ротора и чем выше интенсивность его оборотов, тем эффективнее работает устройство.

Метод
центрифугирования
применяют в
случаях, когда надо
разделить смесь с
компонентами,
которые
различаются
плотностью.



Классификация центрифуг

По месту расположения в пространстве

- настольные,
- подстольные,
- напольные.

Настольные центрифуги

Как правило, центрифуги весом до 100 кг считаются настольными. Их установка происходит на устойчивых горизонтальных поверхностях, расположенных в лабораториях.

Ножки таких устройств должны быть противоскользящими. Это могут быть прорезиненные присоски или другие крепления подобного рода.

Для нормального функционирования и работоспособности настольной центрифуги необходимо обеспечить свободное пространство вокруг нее в пределах как минимум 30 см.

Нежелательно устанавливать более одной центрифуги на поверхность стола, так как возможный диссонанс в амплитуде колебаний при их одновременной работе может привести к чрезмерным вибрациям.



Подстольные центрифуги

Встречаются не так уж часто. Обычно они снабжены колесиками и имеют фиксирующие тормоза. Все необходимые кнопки управления расположены сверху на крышке.

Высота подобного агрегата не превышает 70 см, что позволяет ее разместить в небольшом пространстве с минимальными потерями полезных площадей.

Такие машины актуальны в передвижных лабораториях или госпиталях.



Напольные центрифуги – это стационарные устройства, обычно используемые на промышленных объектах.



По размеру

- микроцентрифуги (предназначены для пробирок до 3–5 мл и применяются для клинических и молекулярных исследований. Скорости вращения достаточно для изучения молекул ДНК);
- центрифуги малого объема (используют для научных, и исследовательских задач);
- универсальные центрифуги (средний объем) (область применения — диагностические центры и медицинские учреждения);
- центрифуги большого объема (аппараты, разработанные для исследования больших объемов материалов, справляются с повышенными нагрузками. Применяются в различных сферах).

По типу прибора:

- общелабораторные,
- специализированные (гематокритные, клеточные, для пищевой промышленности, ветеринарные и т.д.).

Первый тип центрифуги является наиболее востребованным и распространенным.

Второй — разработан с учетом индивидуальной специфики исследования или отрасли.

По возможности рефрижерации:

- центрифуги без охлаждения;
- устройства, оснащенные системой охлаждения.

У **первых** ротор функционирует как вентилятор. Воздух из помещения засасывается в центрифугу и после циркуляции выходит обратно через имеющиеся отверстия. При этом температура разделяемого содержимого и ротора будет комнатной или чуть выше.

Вторые позволяют охлаждать исследуемое вещество в процессе анализа, или же охлаждение необходимо для предотвращения нагревания ротора, например, в ультрацентрифугах.

По скорости вращения ротора:

- на малоскоростные устройства, в которых частота работы ротора составляет до 25 000 оборотов в минуту;
- скоростные центрифуги, обладающие скоростью вращения до 40 000 оборотов в минуту (суперцентрифуги);
- сверхскоростные центрифуги, в которых скорость вращения ротора свыше 40 000 оборотов в минуту (ультрацентрифуги).

Конструктивные особенности центрифуги

Основное отличие между центрифугами заключается в конструктивном исполнении.

Оно может быть разным и зависит от того, в каких целях будет использовано данное оборудование в дальнейшем.

- Центрифуга представляет собой барабан, оснащенный отверстиями разного диаметра. В них под различным углом устанавливаются пробирки с исследуемыми материалами.
- Центрифуга имеет мощный мотор и герметичную крышку.



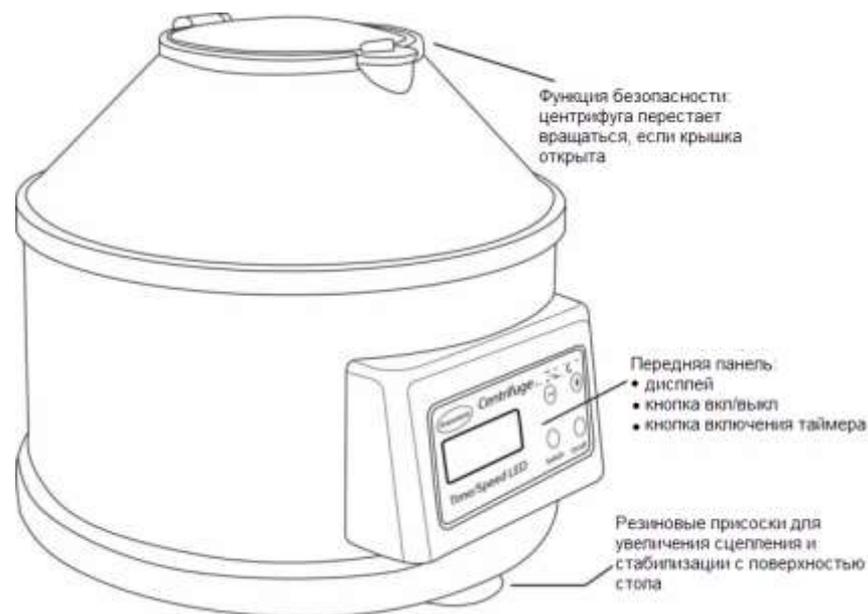
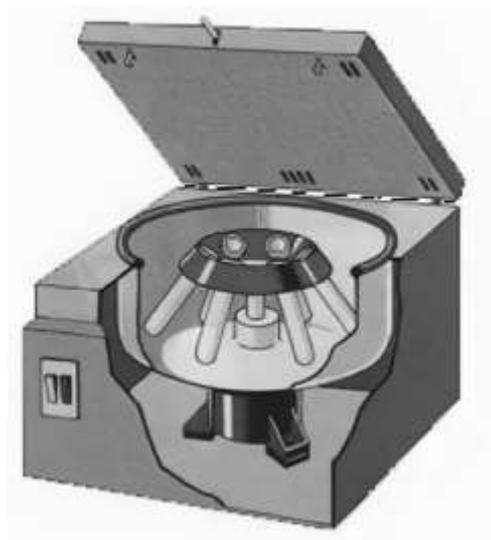
Элементы устройства

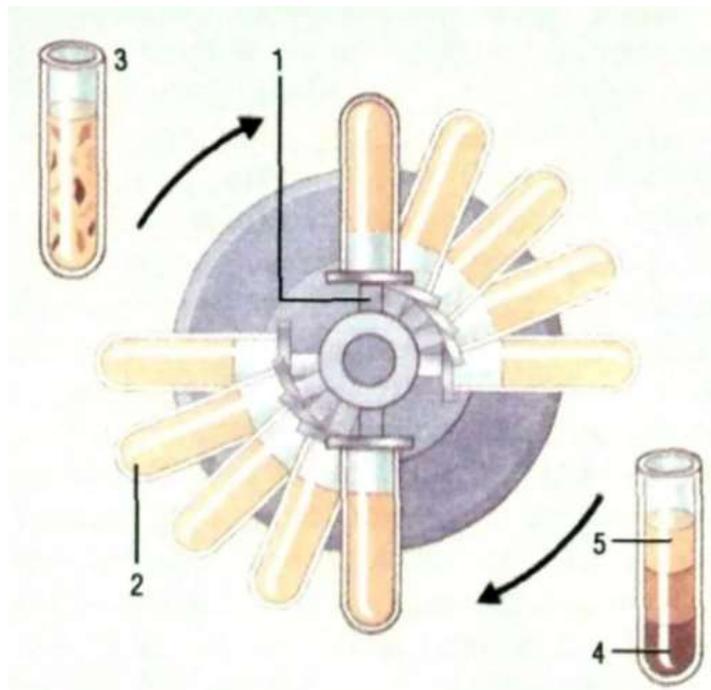
Современные центрифуги, применяемые в лабораторной и медицинской практике, оснащены многими полезными функциями, например, такими как таймер, сменные насадки, регулятор скорости вращения устройства и другие.

Более дорогие модели могут быть оснащены дисплеем, датчиками, детекторным устройством, системой охлаждения, автоматической блокировкой крышки и т. д.

Но основные элементы неизменны, и это:

- Корпус устройства и герметичная крышка.
- Специальная рабочая камера, в которую помещаются пробирки.
- Ротор.
- Двигатель.
- Пульт управления.
- Блок питания.





В лабораторной центрифуге имеются крепления (1) для пробирок (2). Ротор вращается со скоростью нескольких тысяч оборотов в мин, для чего служит особый двигатель. Смесь разделяется на слои, причем более плотное вещество (4) оседает на дно пробирок, а самое легкое (5) поднимается наверх.

Типы роторов:

- бакетный ротор;
- угловой ротор.

Бакетный ротор (горизонтальный ротор, ротор с качающимися стаканами, ротор с переменным углом)



Горизонтальные роторы называются так потому, что их стаканы или штативы, которые удерживают центрифужные пробирки, благодаря особому креплению под действием центробежных сил могут подниматься в горизонтальное положение.

Поэтому во время работы центрифуги частицы беспрепятственно перемещаются в радиальном направлении от центра вращения и равномерно оседают на дне пробирки или другой емкости.

Осадок имеет гладкую ровную поверхность, что упрощает удаление супернатанта. С помощью множества адаптеров пробирки разных типов можно центрифугировать одновременно при условии сбалансированности загрузки.

Центробежная сила —————→



Осадок с гладкой
ровной поверхностью

Осаждение
в горизонтальном роторе

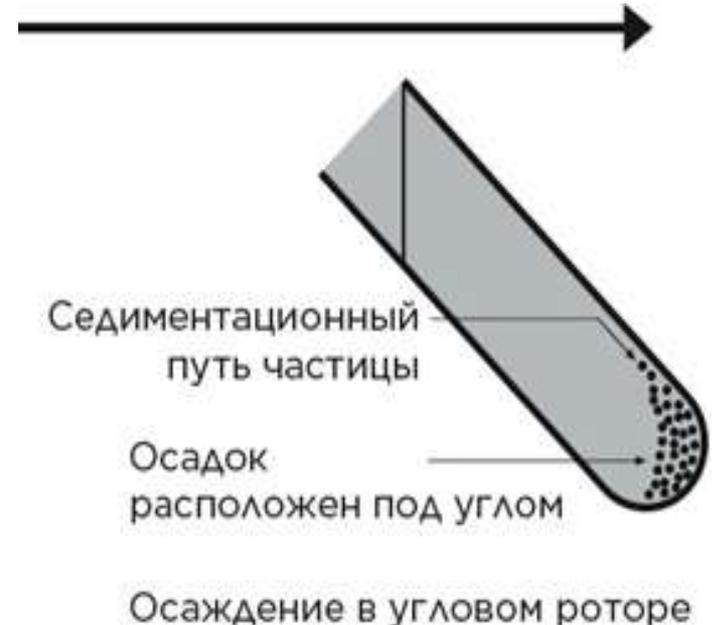
Угловой ротор



Угловые роторы удерживают пробирки под углом к оси вращения. Величина этого угла у каждого ротора своя и, как правило, укладывается в диапазон от 25° до 40° .

Хотя в угловых роторах частицы тоже перемещаются в радиальном направлении, очень скоро они достигают стенки пробирки, по которой скользят на дно. В результате осаждение достигается быстрее, чем в бакетных роторах, имеющих более длинный седиментационный путь.

Но поскольку дно пробирки не перпендикулярно центробежным силам, некоторые частицы будут оставаться на стенке пробирки. Поэтому получить плотный осадок в таких роторах сложнее, чем в горизонтальных.



Принцип выбора ротора

Если требуется **быстро осадить мелкие частицы**, рекомендуется использовать **угловые роторы**. Конструкция этих роторов позволяет разгонять их до более высоких скоростей по сравнению с горизонтальными. Можно **установить большее количество пробирок** в такой ротор с меньшим расстоянием между ними, что увеличивает производительность.

Осаждение **более крупных частиц** – клеток, белковых преципитатов, комплексов антиген-адсорбент, кристаллов мочевой кислоты и др. – можно выполнять при более низких скоростях **в горизонтальных роторах**. Экранированные горизонтальные роторы обладают лучшими аэродинамическими свойствами и позволяют достичь больших значений центробежных сил. **Разделение клеток по плотности** лучше проводить в **горизонтальном роторе**.

Благодаря различным аксессуарам горизонтальные роторы подходят для широкого спектра приложений.

- Подвешенные к ротору стаканы могут удерживать большие емкости, такие как мешки или бутылки с кровью.
- Адаптеры, вставляемые в эти стаканы, позволяют устанавливать в них несколько небольших пробирок и центрифугировать их одновременно, например, в ходе радиоиммуноанализа (РИА).
- Горизонтальные роторы могут быть оборудованы штативами или кронштейнами для центрифугирования РИА-пробирок или микропланшетов.



Как выбрать центрифугу?



Выбирая центрифугу для лабораторных и медицинских исследований, следует учитывать несколько факторов.

- В первую очередь необходимо определиться, какие типы анализов будут проводиться при помощи данного оборудования.
- В области биохимии, гематологии, иммунохимии, цитологии применяются разные устройства с разными техническими характеристиками и рабочими режимами.

- Далее нужно определить объемы будущих исследований и то, какие виды исходных материалов планируется использовать.
- Нелишним будет учесть и требования безопасности.
- Если планируется исследовать небольшие объемы веществ, то микроцентрифуги для этих целей будет достаточно.

Для небольшой или передвижной лаборатории нет необходимости приобретать громоздкое оборудование, ведь в таком случае объем исследований будет маленьким.

Как правило, большие центрифуги оснащены массой дополнительных функций, которые, скорее всего, не будут задействованы. Незачем переплачивать лишнее.

Компактная настольная лабораторная центрифуга будет идеальным решением в данной ситуации. Так как ее размеры небольшие, она не будет мешать при проведении других исследовательских мероприятий. Для нее очень просто и легко обеспечить питание (подключается к обычной розетке).

На какие технические параметры обращать внимание при выборе центрифуги?

Модель	Т20-2080	1850B	1760G
диаметр барабана	520 (mm)	650(mm)	760(mm)
длина барабана	2080 (mm)	2200(mm)	3182(mm)
скорость с регулированием	1000(r/min)	2800(r/min)	2650(r/min)
Ф-сила	2610	2651	3080
размеры удаляемых	2-5 (µm)	2-5 (µm)	2-5 (µm)
главный мотор	45(kw)(электрик.)	75(kw)(электрик.)	132(kw)(электрик.)
всп-ный мотор	18,55(kw)(электрик.)	22(kw)(электрик.)	37(kw)(электрик.)
макс. пропускн-сть	10-30(m³/h)	30-60(m³/h)(в зависимости от фактической концентрации материала)	±118(m³/h)
вес	5000 (kgs)	8860 (kgs)	ок.12500 (kgs)
габариты	4527x1248x1429(mm)	4583x1583x1710(mm)	6900x1930x2040(mm)
сертификация	UL,ATEX,CE,IEC,UL&-AN2 ISO 9001:2015,CE		

- Если вы решили приобрести центрифугу для проведения качественных лабораторных и научных исследований, то в первую очередь обращайтесь внимание на скорость вращения ротора.
- Практика показала, что наиболее востребованы сегодня центрифуги со скоростью в 4000 об/мин, так как для лабораторных условий такого значения достаточно.
- Обратите внимание на дискретность – шаг, при помощи которого меняется частота вращения устройства. Чем он меньше, тем функциональнее центрифуга.

- Тип ротора может быть горизонтальным или угловым.
- Узнайте, сколько пробирок помещается за одну закладку в центрифугу.
- Уточните допустимый объем пробирок.
- Обратив внимание на вышеперечисленные технические характеристики, вы сможете выбрать оптимальное устройство по хорошей цене. Цена центрифуг обычно варьируется от 18 до 270 тысяч рублей.

Основные правила центрифугирования

- Установка центрифуги производится в строго горизонтальном положении.
- На одном лабораторном столе не рекомендуется ставить более одной центрифуги и какого-либо оборудования, чувствительного к вибрации.
- Напольная центрифуга должна быть размещена на твердом покрытии пола: бетонная стяжка, керамическая плитка.
- Во избежание поражения электрическим током центрифугу необходимо заземлить.
- Установка центрифуги производится таким образом, чтобы у вентиляционных отверстий оставалась свободная зона не менее 30 см.

Основные правила центрифугирования

- Потоки воздуха от центрифуги не должны быть направлены на людей.
- Воздух в помещении не должен содержать примесей агрессивных паров и газов.
- Во избежание инфицирования, повреждений кожных покровов необходимость работать в перчатках.
- Пробирки следует наполнять не более, чем на 1 см от края.
- Нельзя загружать в ротор нечетное число пробирок, а при неполной загрузке ротора пробирки следует размещать симметрично, одна против другой, обеспечивая таким образом равномерное распределение пробирок относительно оси вращения ротора.
- Центрифужные пробирки вместе с их содержимым должны быть тщательно уравновешены и различаться по весу не более чем на 0,25 г.
- Нельзя применять самодельные пробирки;
- Запрещено включать центрифугу вместе с гайкой, предназначенной для стопорения привода при транспортировке.

Основные правила центрифугирования

- При установке не закрывающихся пробирок, пробирки заполнять на 75% максимального объема.
- Перед началом работы центрифугирования необходимо убедиться, что ротор надежно закреплен и свободно вращается.
- При закрывании крышки центрифуги должен быть слышен "щелчок" включения микровыключателя блокирующего устройства.
- Крышку ротора центрифуги разрешается открывать только после полной остановки ротора.
- Должен соблюдаться правильный выбор параметров центрифугирования согласно инструкции производителя центрифуги (тип ротора, адаптера, скорость и продолжительность вращения, величины центробежного ускорения, допустимый уровень дисбаланса, соблюдение температурного режима).

Центрифугирование делят на:

- препаративное;
- аналитическое.

Препаративное центрифугирование

Заключается в выделении биологического материала для последующих исследований. При этом можно брать большие количества исходного биологического материала, например посеvy микробных клеток из периодических или непрерывных культур, а также посеvy растительных и животных клеток из культур ткани и плазмы крови.

С помощью препаративного центрифугирования выделяют большое количество клеточных частиц для изучения их морфологии, структуры и биологической активности.

Метод применяется также для выделения таких биологических макромолекул, как ДНК и белки из предварительно очищенных препаратов.

Виды препаративного центрифугирования

- Дифференциальное центрифугирование
- Зонально-скоростное центрифугирование
- Изопикническое центрифугирование
- Равновесное центрифугирование в градиенте плотности

Дифференциальное центрифугирование

Этот метод основан на различиях в скоростях седиментации частиц, отличающихся друг от друга размерами и плотностью.

Дифференциальное центрифугирование является, по-видимому, самым распространенным методом выделения клеточных органелл из гомогенатов тканей.

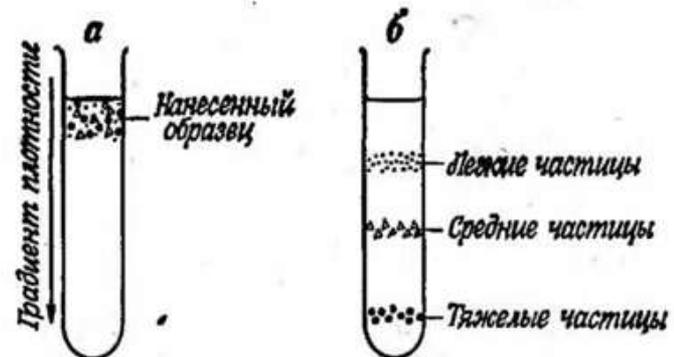
А также этот метод лежит в основе преаналитической обработки биологического материала в кдл.

Зонально-скоростное центрифугирование

Метод зонально-скоростного, или, как его еще называют, *s*-зонального центрифугирования, заключается в наслаивании исследуемого образца на поверхность раствора с непрерывным градиентом плотности.

Затем образец центрифугируют до тех пор, пока частицы не распределятся вдоль градиента в виде дискретных зон или полос. Благодаря созданию градиента плотности удается избежать смешивания зон, возникающего в результате конвекции.

Метод зонально-скоростного центрифугирования применяется для разделения гибридов РНК—ДНК, субъединиц рибосом и других клеточных компонентов.



Аналитическое центрифугирование

Применяется главным образом для изучения чистых или практически чистых препаратов макромолекул или частиц, например рибосом.

В данном случае используется небольшое количество материала, а седиментация исследуемых частиц непрерывно регистрируется с помощью специальных оптических систем.

Метод позволяет получать данные о чистоте, молекулярной массе и структуре материала.

Применение аналитического ультрацентрифугирования

- Определение молекулярной массы
- Оценка чистоты препаратов
- Исследование конформационных изменений в макромолекулах

Режимы центрифугирования

При перечислении условий разделения частиц указывают

- скорость вращения,
- радиус ротора,
- время центрифугирования.

Центробежное ускорение обычно выражают в единицах g , рассчитанных из среднего радиуса вращения столбика жидкости в центрифужной пробирке.

Относительное центробежное ускорение (ОЦУ, RCF, rcf - relative centrifugal field)

Относительное центробежное ускорение (RCF - relative centrifugal field) – физическая величина, позволяющая описать и сравнить поля центробежных сил, создаваемых роторами разных размеров, вращающихся при разных скоростях.

Так же как длина измеряется в миллиметрах или дюймах, а время – в часах или минутах, относительное центробежное ускорение измеряется в единицах, кратных ускорению свободного падения на Земле, обозначаемого латинской буквой g .

Оно служит для сравнения производительности разделения и осаждения. Относительное ускорение центрифуги зависит от частоты вращения и радиуса центрифугирования.

Угловую скорость вращения ротора в об/мин либо **рассчитывают по формуле**, либо **определяют по номограмме Доула и Котциаса**.

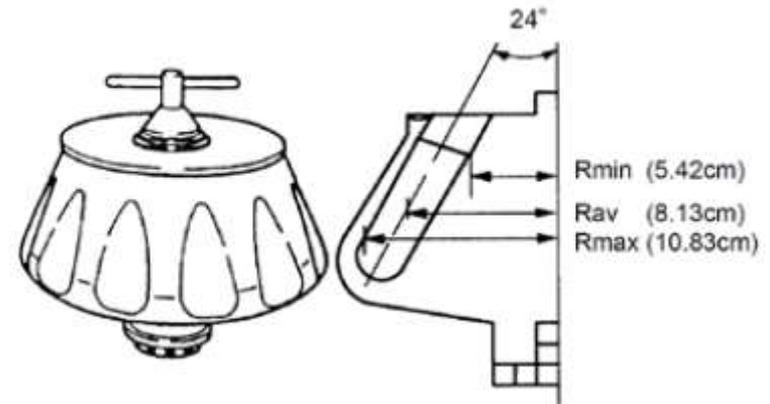
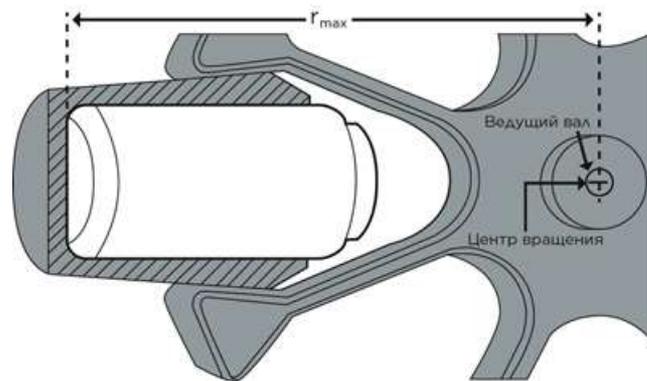
Существует простая формула для расчета относительного центробежного ускорения:

$$RCF = 1.12r \left(\frac{RPM}{1000} \right)^2$$

где RCF (относительное центробежное ускорение - ОЦУ), r – радиус, который представляет собой расстояние в миллиметрах (мм) от центра вращения до некоторой точки внутри ротора (см описание центрифуги), RPM (revolutions per minute) - скорость вращения в оборотах в минуту (об/мин).

Иногда радиус (r) указывают в сантиметрах. И тогда перед использованием формулы следует перевести его в миллиметры, умножив на 10.

Чтобы определить максимальное RCF ротора, нужно знать максимальную скорость вращения и максимальный радиус (r_{max}) – расстояние от центра вращения до дна лунки или стакана ротора во время центрифугирования. Почти все производители центрифуг указывают эту информацию о роторах в руководствах по эксплуатации.



Некоторые центрифуги автоматически переводят центробежное ускорение в угловую скорость.

Например, максимальное RCF ротора при максимальной скорости 4 200 об/мин и $r_{\max} = 254$ мм (см описание центрифуги) составляет:

$$\text{RCF} = 1.12r \left(\frac{\text{RPM}}{1000} \right)^2 = 1.12 \times 254 \times \left(\frac{4200}{1000} \right)^2 = 5018 \times g.$$

Если этот же самый ротор вращается с меньшей скоростью, например, 2 000 об/мин, то и RCF будет меньше:

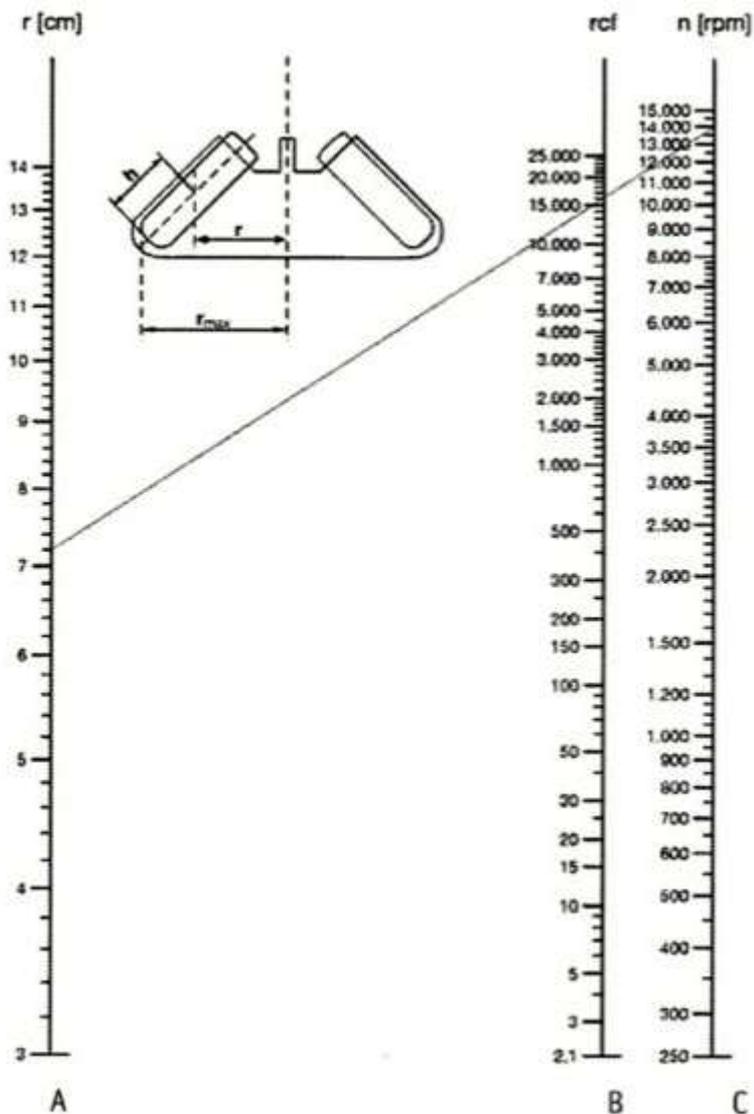
$$\text{RCF} = 1.12 \times 254 \times \left(\frac{2000}{1000} \right)^2 = 1138 \times g.$$

Поскольку RCF пропорционально квадрату скорости вращения ротора, то любые изменения последней сильно влияют на RCF.

Существует номограмма, выражающая зависимость относительного ускорения центрифуги (**rcf**) от скорости вращения ротора (**n**) и радиуса (**r**) – среднего радиуса вращения столбика жидкости в центрифужной пробирке (т.е. расстояния от оси вращения до середины столбика жидкости).

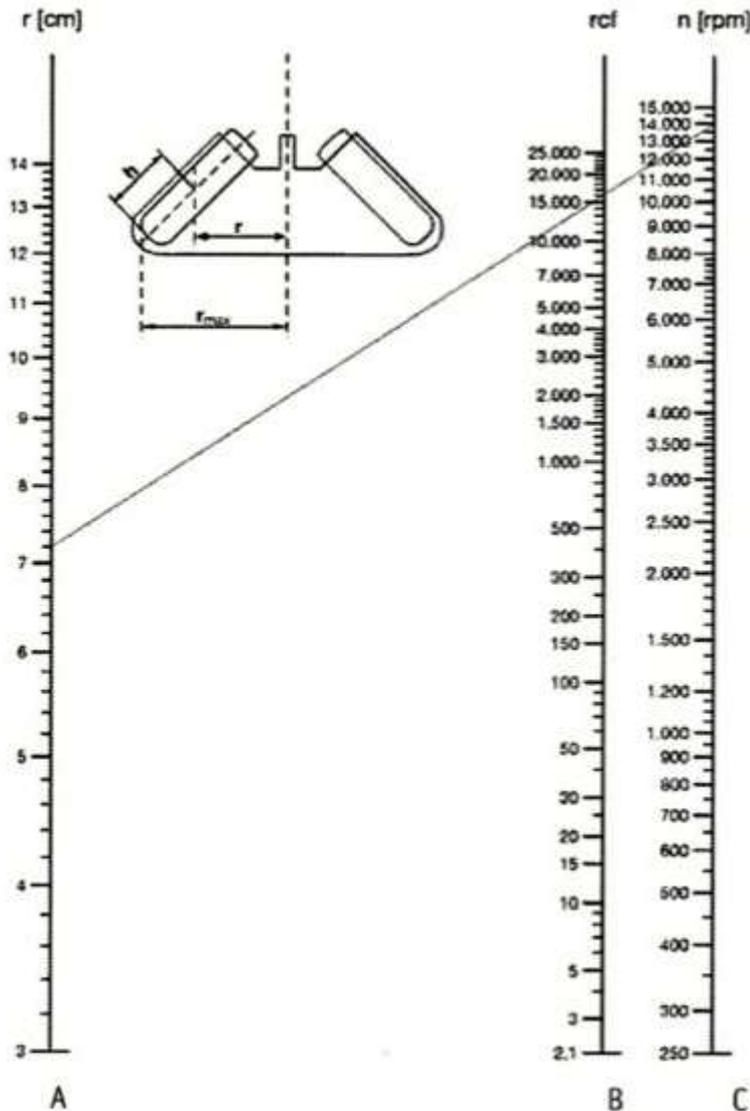
Радиус измеряется в **см!!** от оси вращения ротора до середины столбика жидкости в пробирке, когда держатель находится в положении центрифугирования.

Номограмма для определения относительного ускорения центрифуги (rcf) в зависимости от скорости вращения и диаметра ротора



- **r** – радиус ротора, см
- **n** – скорость вращения ротора, оборотов в минуту
- **rcf** (relative centrifuge force) – относительное ускорение центрифуги
- Радиус центрифугирования r_{\max} – это расстояние от оси вращения ротора до дна гнезда ротора.

Номограмма для определения относительного ускорения центрифуги (rcf) в зависимости от скорости вращения и диаметра ротора



- Для определения ускорения с помощью линейки совмещаем значения радиуса и числа оборотов и на шкале rcf определяем его величину.
- **Пример:** на шкале A отмечаем значение радиуса для ротора – 7,2 см, на шкале C отмечаем значение скорости ротора – 14000 об/мин, соединяем эти две точки. Точка пересечения образованного отрезка со шкалой B показывает значение ускорения для данного ротора. В данном случае ускорение равно 15000.

Назначение центрифуг в медицине

Данный прибор предназначен не только для разделения жидких веществ на составляющие, а и для отделения твердых фракций от жидкостей.

Жидкости, в состав которых входят частицы разной степени тяжести, легко распределяются на составляющие при помощи лабораторной центрифуги.

Это могут быть не только кровь или лимфа, но и различные суспензии.

Центрифугированию в лабораториях подвергают:

- кровь;
- мочу;
- кал;
- клеточный материал для жидкостной микроскопии (циторотеры);
- ткани с препаративной целью;
- в молекулярной биологии методом центрифугирования разделяют клеточные компоненты.

Наиболее часто исследуют кровь человека. При помощи специальных центрифуг можно приготовить препараты крови, получить сыворотку крови, плазму крови, тромбоцитарную массу и многое другое.

Режимы центрифугирования
разных объектов и с разными
целями значительно
отличаются

Центрифугирование крови

Центрифугирование крови в клинической практике применяется с целью получения материала или готовых образцов для последующего анализа, определение гематокритного числа, а также для подготовки препаратов из донорской крови и компонентов для аутотрансфузии.

Требования к подготовке проб крови к транспортировке

Перечень процедур по подготовке проб крови к транспортировке зависит от вида лабораторных исследований, используемых вакуумных пробирок, времени и условий транспортировки.

Например, проба крови, взятая для исследования на АКТГ, ангиотензин I, II, ренин, альдостерон, гомоцистеин, альцитонин, остеокальцин должна быть сразу после взятия помещена в лед и как можно скорее отцентрифугирована.

Все эти процедуры необходимо изложить в инструкции по взятию проб крови на лабораторные исследования.

Каждая централизованная КДЛ должна разработать свою инструкцию и обеспечить всех процедурных медицинских сестер всех ЛПУ, которые она обслуживает.

Пробы крови

- **Цельная кровь** – проба венозной, артериальной или капиллярной крови в которой концентрация и свойства клеточных и внутриклеточных компонентов остаются относительно неизменными по сравнению с состоянием *in vivo*.
- Добавление антикоагулянтов в пробу цельной крови стабилизирует клеточные и внутриклеточные компоненты на определенный период времени.
- Применяется для проведения клинического анализа крови, гликированного гемоглобина.

Методика получения сыворотки крови

Оборудование

1. Пробирки для взятия крови с активатором свертывания.
2. Стеклянные палочки или пастеровские пипетки с запаянными на конце капиллярами (для отделения сгустка).
3. Центрифуга лабораторная (до 3000 об/мин).

Сыворотка – биологическая
бесклеточная жидкость, не содержащая
факторов свертывания крови и
фибриногена.

Сыворотка – в пробирках без антикоагулянта, с clot-activator



Приготовление сыворотки

Венозная кровь, полученная без антикоагулянтов в пробирку для получения сыворотки крови с активатором свертывания, отстаивается в ней при комнатной температуре (15-20⁰С) в течение 30 минут до полного образования сгустка. По окончании образования сгустка (ретракции) пробирки открывают и осторожно проводят тонкой стеклянной палочкой или запаянным капилляром пастеровской пипетки по внутренним стенкам пробирки по окружности в верхнем слое крови для отделения столбика сгустка от стенок пробирки.

Сыворотку сливают в стерильную одноразовую центрифужную пробирку, придерживая сгусток стеклянной палочкой и центрифугируют, либо центрифугируют в тех же, первичных, пробирках.

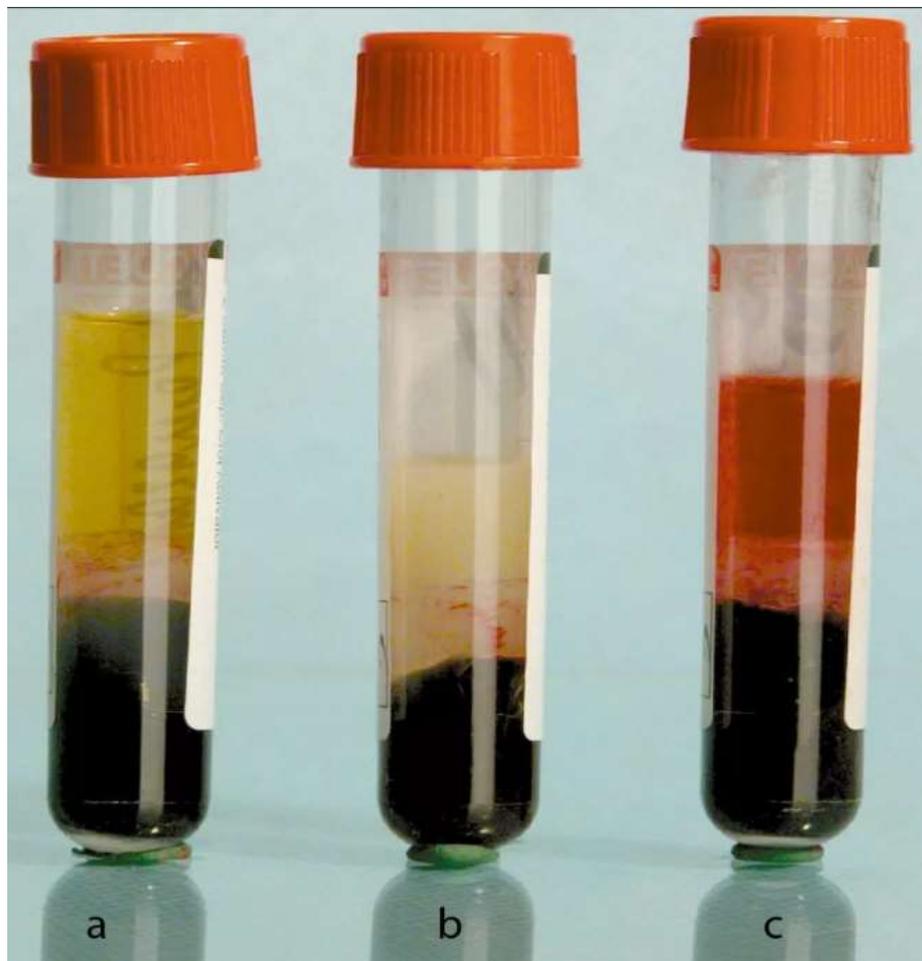
Центрифугирование

Пробирки центрифугируют при относительной центробежной силе RCF от 1000 до 1200g (максимально до 1500g) в течение 10 минут.

В случае использования микропробирок и центрифуги для них центрифугирование проводят при 6000-15000g в течение 1,5 минут.

При использовании пробирок с разделительным гелем скорость 1500-2000g 10 мин.

После центрифугирования сыворотку сливают во вторичные (транспортные) пробирки. Сыворотка не должна быть гемолизированой.



а) Иктеричность, б) хилез (липемия),
с) гемолиз.

Получение плазмы крови

Методика получения плазмы

Плазму получают из крови путем отделения клеток крови.

Плазма крови представляет собой бесклеточную надосадочную жидкость, которая получается при центрифугировании крови, свертываемость которой ингибирована добавлением антикоагулянтов тотчас после взятия.

В плазме содержатся факторы свертывания крови.

Методика получения плазмы

Венозную кровь, полученную с антикоагулянтом немедленно после взятия перемешивают переворачиванием пробирок с кровью, закрытых крышками, не менее 5 раз. Перемешивание должно осуществляться без встряхивания и пенообразования. Время между началом наложения жгута и смешиванием крови с антикоагулянтом не должно превышать 2 минут.

После уравнивания пробирок с кровью, их центрифугируют.



Методика получения плазмы

Если для получения плазмы использовали пробирки с ЭДТА, то их центрифугируют при RCF 1200-1300g, но не более 1500g, в течение 10-15 минут.

Для молекулярной диагностики пробирки с ЭДТА и разделительным гелем центрифугируют 1100g 10 мин.

Плазму немедленно сливают в транспортную пробирку. Пробирки закрывают крышкой.



Методика получения плазмы

Пробирки для исследования плазмы с гепарином центрифугируют 1500-2000g 10 мин.

Пробирки для исследования глюкозы центрифугируют 1300g 10 мин.



Исследование гемостаза

Перед центрифугированием необходимо визуально проверить полученные для исследования пробы крови (маркировку, наличие гемолиза, липемии и сгустков). Образцы, содержащие сгустки, бракуются.

Для визуального выявления «подсвертывания» необходимо медленно наклонить пробирку с образцом; при правильных взятии и обработке крови происходит равномерное ее перетекание, соответствующее углу наклона пробирки, и на стенках не остается багровых образований овальной или иной формы.

Получение плазмы для исследования гемостаза

Богатая тромбоцитами плазма

Используют для исследования агрегационной функции тромбоцитов, которое следует выполнить в течение 2 ч после взятия крови.

Цитратная плазма, богатая тромбоцитами, получается при центрифугировании стабилизированной цитратом крови при 140-160g (~1000 об/мин) в течение 5 мин. Торможение центрифуги должно быть плавным.

Сразу же после центрифугирования богатую тромбоцитами плазму переносят в пластиковые пробирки пипетками со сменными наконечниками.

Замораживание образцов богатой тромбоцитами плазмы недопустимо.

Бедная тромбоцитами плазма

Используют для определения большинства показателей гемостаза (определение ПВ и ТВ, АЧТВ, концентрации фибриногена, активности АТ III, протеина С, уровня плазминогена и других параметров фибринолиза, маркеров тромбинемии – растворимого фибрина и D-димера).

Цитратная плазма, бедная тромбоцитами, обычно еще содержит тромбоциты, но в малых количествах.

Для ее получения стабилизированную кровь или плазму, богатую тромбоцитами, центрифугируют при 1200-1400g (~3000-4000 об/мин) в течение 15 мин без охлаждения, а затем надосадочную жидкость переносят в пластиковые пробирки.

Бестромбоцитная плазма

В ряде ситуаций, например при определении волчаночного антикоагулянта, проведении dRVV-теста или при необходимости замораживания и хранения материала, требуется бестромбоцитная плазма.

Ее получают путем повторного центрифугирования плазмы, бедной тромбоцитами, при 1700-1900 g в течение 20 мин.

Следует осторожно относиться к рекомендациям центрифугировать образцы крови с ускорением более 2500 g и охлаждением, поскольку при увеличении центробежной силы и снижении температуры возможно разрушение клеток крови.

Кроме фракционирования крови для биохимического анализа, центрифугирование входит в методики проведения ряда диагностических исследований, включая:

- Определение гематокритного числа.
- Подготовка препаратов методом жидкостной цитологии.
- Фракционирование цитоплазмы и ядер для проведения иммунохимических и генодиагностических исследований и др.

Определение гематокритного числа

В данном случае используются специальные роторы, адаптированные под работу с гематокритными капиллярами.

В современных специализированных и универсальных медицинских центрифугах эти устройства оснащаются ридерами того или иного типа для подсчета гематокритного числа непосредственно на роторе.

Такая возможность существенно повышает точность анализа.

Режим центрифугирования в этом случае сильно зависит от конструкции центрифуги. Колеблется от 1000 до 18000g. См описание к центрифуге. Время экспозиции около 5 мин.



Подготовка препаратов методом жидкостной ЦИТОЛОГИИ



Центрифугирование крови при подготовке препаратов для исследования клеточного материала под микроскопом производится в цитороторах – сложных устройствах, комплектуемых держателями образцов и предметных стекол различной конструкции. От устройства циторотора и характеристик центрифуги напрямую зависит качество образца, и, следовательно, информативность результатов анализа.

Цитоцентрифугирование



ГОСТ Р 57004-2016

Во время пробоподготовки к методу жидкостной цитологии материал подвергается двукратному центрифугированию.

Первый раз - в щадящем режиме в течение 2 минут при 200 g.

После удаления супернатанта для уплотнения осадка - в течение 10 минут при 800 g.

Центрифугирование мочи

Для приготовления осадка мочи должны использоваться центрифуги, обеспечивающие не менее 1500 оборотов в мин.

При использовании центрифуги необходимо строго следовать инструкции производителя.

Центрифужные пробирки из стекла или пластика должны быть прозрачными для обеспечения макроскопического изучения мочи и достаточно прочными, чтобы не разбивались при центрифугировании. Они должны иметь коническую форму для концентрирования осадка, быть градуированными для стандартизации объема центрифугируемой мочи.

Пробирки должны быть химически чистыми и маркированными для правильной идентификации пациента.

Объем мочи, используемый для центрифугирования, должен быть выбран в каждой лаборатории и использоваться постоянно, например, 10 мл; если в каких-либо случаях будут использоваться меньшие объемы (например, в педиатрии, неонатологии), это отмечается в заключении.

В центрифужную пробирку помещают около 10 мл из утренней порции мочи после тщательного ее перемешивания.

Угловая скорость центрифугирования зависит от радиуса центрифуги.

При использовании центрифуги радиусом 17–18 см центрифугирование производится при угловой скорости **1500 об/мин** в течение **10 мин.**

При использовании центрифуги другого радиуса мочу центрифугируют **при 400g** также **в течение 10 мин.**

Центрифугирование кала

Центрифугирование кала часто проводят при паразитологических методах исследования для выявления в них различных форм паразитов.

Режимы центрифугирования кала при основных паразитологических исследованиях

Метод		Формалин-эфирный	Уксусно-эфирный	Химико-седиментационный	Бермана
Центрифугирования Режим	Скорость вращения ротора, об/мин	3000 (1500)	3000 (1500)	1500-2000	1500
	Время, мин	1 (2)	1 (2)	5	1-2

Устройство для концентрирования кишечных паразитов Parasep (Парасеп)

- 1) Добавить в пробирку с формалином примерно 0,9 мл этилацетата.
- 2) С помощью шпателя на конце конической камеры внести 0,5 г пробы фекалий в пробирку с реактивами, перемешать образец, используя камеру со шпателем.
- 3) Соединить камеру с фильтром-шпателем и пробирку с образцом с помощью резьбы.
- 4) Центрифугировать получившееся устройство в любой стандартной центрифуге (бакет-ротатор на пробирки объемом 15 мл) в течение 1 мин при 3000 g или 5 мин при 1500 g .
- 5) Аккуратно отсоединить коническую камеру с отфильтрованным осадком, с помощью Пастеровской пипетки удалить надосадочную жидкость и каловую пробку, отобрать осадок для микроскопического исследования.



Правила санитарной обработки и дезинфекции медицинских центрифуг

Как и любое иное оборудование клинических лабораторий, медицинские центрифуги подлежат регулярной обработке в рамках требований, установленных действующими правилами санитарно-эпидемиологического режима.

При этом необходимо соблюдать рекомендации производителя относительно способов механической, химической и биологической очистки корпуса, центрифужной камеры, роторов и аксессуаров.

Очистка и дезинфекция роторов

Не менее одного раза в месяц ротор центрифуги необходимо демонтировать, после чего очистить и смазать вал, на котором было закреплено устройство. Это позволит исключить скапливание жидкости между ротором и валом, приводящее к коррозии и создающее условия для развития микрофлоры.

Регулярный уход за роторами осуществляется с помощью влажных салфеток со специальными пропитками или мягкой ветоши с мыльным раствором.

После использования мыльного раствора его остатки удаляются под проточной водой (устройство должно быть извлечено из центрифуги) или с помощью влажных салфеток.

По окончании любых процедур поверхности ротора должны быть сухими – при необходимости для удаления остатков влаги используют чистую сухую салфетку или сушат устройство иным подходящим способом.

При необходимости работы в стерильных условиях роторы подлежат обеззараживанию. Дезинфекция также проводится, если существует вероятность загрязнения ротора инфицированным материалом.

Обработку устройств можно проводить с помощью химических растворов или автоклавирования. Параметры автоклавирования указываются в технических характеристиках роторов.

Для обеззараживания химическим способом могут использоваться дезинфектанты, в состав которых входит этиловый спирт, этиленгесканол, анионные ПАВ, n-пропанол, ингибиторы коррозии. В руководстве по эксплуатации ротора и центрифуги указываются рекомендуемые средства для дезинфекции. Если в состав противомикробного средства входят иные вещества, свяжитесь с представителем нашей сервисной службы для уточнения возможности его использования.

Выбор оптимального метода и дезинфектанта зависит от материала, из которого изготовлен ротор.

Уход за резиновыми
уплотнителями, крышками из
поликарбоната, пластиковыми
втулками

Для того чтобы резиновые уплотнители роторов, крышек центрифужных камер и других рабочих модулей центрифуги сохраняли свои рабочие характеристики, их необходимо тщательно очищать от механических загрязнений с помощью мыльного раствора или специальных средств по уходу за резиновыми деталями.

Если такое средство отсутствует, исключить проворачивание уплотнительного кольца после его очистки позволит втирание небольшого количества медицинского талька.

Для гарантии полной герметичности при появлении первых признаков хрупкости или трещин резиновый уплотнитель необходимо заменить.

Пластиковые вкладыши в гнезда роторов, как и сами устройства, можно обрабатывать автоклавированием или с помощью дезинфектантов с подходящим составом.

Если в процессе центрифугирования произошло разрушение стеклянного сосуда, резиновые уплотнители и пластмассовые адаптеры подлежат утилизации даже в случае отсутствия каких-либо дефектов при визуальном осмотре.

Дезинфекция центрифуг,
используемых для получения
лечебной плазмы

Особые требования предъявляются к обеззараживанию роторов и рабочих поверхностей центрифуг, с помощью которых получают биоматериал для лечебных процедур – плазмолифтинга и плазмафереза.

Эти приборы должны удовлетворять требованиям санитарного режима, которые предъявляются к оборудованию и инструменту, используемому в условиях процедурных кабинетов.

Каждое из устройств можно автоклавировать при температуре 121° в течение 20 минут. В некоторых случаях роторы автоклавируются вместе с центрифужными пробирками или флаконами, при этом как сами роторы, так и емкости для должны быть открытыми.

Необходимо помнить, что обработка в автоклаве снижает рабочий ресурс полипропиленовых роторов и их частей, так как ускоряет процесс старения полимерных материалов. Поэтому после 10-ти циклов автоклавирования ротор из полипропилена или пластиковую крышку необходимо заменить.

Уход за корпусом и центрифужной камерой

Перед санитарной обработкой центрифуги следует убедиться, что прибор отключен от электросети.

Уход за корпусом и внутренними поверхностями включает ручную очистку, при необходимости – влажную дезинфекцию.

Регулярная обработка может осуществляться с помощью ветоши, пропитанной водой комнатной температуры (не ниже 20° и не выше 25°). При необходимости можно использовать мягкое мыло или ПАВ с разрешенным составом.

Дезинфекцию корпуса и центрифужной камеры необходимо производить химическими средствами, рекомендованными производителями и указанными в инструкции по эксплуатации.

Для этих целей используются дезинфектанты с показателем pH 5-8, лишенные хлора, щелочей, кислот и пероксидов.

Спасибо за внимание!

