

## УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От \_\_\_\_\_ 20\_\_ г

№ \_\_\_\_\_

«Утверждаю»



Генеральный директор

ООО НПФ «АБРИС+»

В.М. Марковский

2012 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

### ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ЦИТОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИКОГЕНА В ЛЕЙКОЦИТАХ (ДИАХИМ-ЦИТОСТЕЙН-ПАС)

#### 1. Назначение

Набор предназначен для цитохимического определения гликогена в лейкоцитах в клинико-диагностических лабораториях.

ПАС-реакция является важным методом для идентификации прежде всего лимфоцитарных клеточных элементов. Вместе с реакцией на миелопероксидазу и неспецифическую эстеразу, ПАС-реакция является одним из основных цитохимических методов для дифференциальной диагностики острых лейкозов.

#### 2. Характеристика набора

##### 2.1. Принцип метода

Механизм ПАС-реакции основан на окислении йодной кислотой гликолевых групп, или их amino- или алкиламино- производных до альдегидов. Альдегидные группировки при взаимодействии с реактивом Шиффа образуют продукт красного цвета.

##### 2.2. Состав набора

- Йодная кислота – 6 флаконов (по 0,5 г)
- Реактив Шиффа - 1 флакон (100 мл);
- Гематоксилин Майера – 1 флакон (100 мл).

#### 3. Аналитические и диагностические характеристики набора

Цитохимические исследования проводят в мазках крови, костного мозга, лейкоконцентрата, спинномозговой жидкости, аспиратах лимфоузлов, селезенки, лейкозных инфильтратах разной локализации.

Мазки крови и костного мозга лучше делать непосредственно из материала, полученного без добавления антикоагулянтов.

При выраженной лейкопении цитохимические исследования целесообразно проводить в препаратах, полученных из лейкоконцентрата венозной крови.

Приготовленные мазки не рекомендуется хранить более 24 часов, т. к. активность большинства внутриклеточных ферментов снижается.

Нефиксированные мазки могут храниться в темноте в течение 3 недель.

В норме гликоген обнаруживается на стадии миелобласта и его содержание в клетках увеличивается по мере их созревания, достигая максимума в палочко- и сегментоядерных нейтрофилах. Гликоген выявляется также в базофилах, эозинофилах, моноцитах, тромбоцитах, и

мегакариоцитах. 5- 30% нормальных лимфоцитов содержат гликоген в виде мелких гранул без диффузного фона.

#### **4. Меры предосторожности при работе с набором.**

Потенциальный риск применения набора – класс 1.

При работе с ним следует соблюдать осторожность и не допускать попадания реагентов на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место большим количеством проточной воды. При проглатывании следует выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

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

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки.

#### **5. Оборудование, материалы, реагенты:**

- лотки для сушки и окраски мазков;
- штатив для просушивания окрашенных стёкол на воздухе в вертикальном или наклонном положении;
- штатив («рельсы») для окраски мазков на предметных стёклах;
- емкости для фиксации и окраски;
- пинцет или щипцы для взятия предметных стёкол с препаратами;
- стёкла предметные;
- микроскоп;
- таймер;
- чашки Петри
- бумага фильтровальная;
- вода дистиллированная;
- масло иммерсионное;
- перчатки резиновые или пластиковые.
- пипетки

#### **6. Анализируемые пробы**

Мазки крови и костного мозга лейкоконцентрата, спинномозговой жидкости, аспираты лимфоузлов, селезенки, лейкозных инфильтратах разной локализации.

Материал должен быть свежесобраным. Срок хранения не более 2 часов.

Препараты, приготовленные из исследуемого материала, могут храниться 3 - 5 дней при комнатной температуре.

#### **7. Проведение анализа**

##### **7.1 Подготовка к анализу**

##### **7.1.1 Приготовление мазков крови и костного мозга:**

2-3 мазка крови (или костного мозга) сделать на предметных стеклах с помощью более узкого предметного шлифованного стекла следующим образом.

На сухое предметное стекло, ближе к короткой стороне наносят пипеткой небольшую каплю крови. Предметное стекло следует держать на столе или в левой руке за узкие края. Правой рукой приставить шлифованное стекло узким краем к стеклу с кровью слева от капли под углом 45° и продвинуть его вправо до соприкосновения с каплей крови. Выждать до тех пор, пока кровь расплывется по всему ребру шлифованного стекла, и затем легким быстрым движением

провести его справа налево до тех пор, пока не будет исчерпана вся капля. Капля крови должна быть небольшой и соразмерна так, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя 1 - 1,5 см до его края. Нельзя сильно нажимать на стекло, так как многие клетки крови могут оказаться поврежденными. Хорошо сделанный мазок тонок, имеет желтоватый цвет и оканчивается "метелочкой".

После приготовления мазки следует быстро высушить на воздухе до исчезновения влажного блеска. При медленном высыхании может изменяться морфология клеток крови.

Приготовление препаратов костного мозга аналогично приготовлению препаратов периферической крови.

## **7.2. Приготовление рабочих растворов реагентов**

### **7.2.1 Приготовление рабочего раствора йодной кислоты.**

Содержимое флакона с йодной кислотой растворить в 50мл дистиллированной воды (получаем 1% раствор йодной кислоты). Раствор сохраняет свои свойства в течение 3 месяцев в темном месте.

### **7.2.2. Реагенты готовые к применению:**

- реактив Шиффа
- гематоксилин Майера

Реагенты можно хранить при комнатной температуре в плотно закрытых флаконах, в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

## **7.3. Проведение анализа**

### **7.3.1. Фиксация мазков**

Приготовленные препараты положить на лотки, выстланные фильтровальной бумагой, и высушить при комнатной температуре в течение 15 – 30 минут.

Высушенный на воздухе препарат зафиксировать в 10% спирт-формалиновой смеси в течение 10 минут, после чего промыть проточной водой в течение 10 секунд.

### **7.3.2. Окраска препаратов**

Предметные стёкла с зафиксированными препаратами поместить на штатив для окраски и на них налить свежеприготовленный рабочий раствор йодной кислоты. Оставить на 10 минут при комнатной температуре.

Промыть дистиллированной водой в течение 10 секунд и промокнуть фильтровальной бумагой. Поместить в реактив Шиффа на 30 минут, после чего промыть препараты в проточной воде в течение 5 минут. Докрасить гематоксилином Майера в течение 15-20 минут. Промыть стекла в проточной воде 10 секунд.

Высушить окрашенный препарат на воздухе при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.

Микроскопировать с иммерсионной системой.

## **8. Результаты окраски:**

Гликоген выявляется в виде гранул красного или красно-вишневого цвета в цитоплазме клеток.

## **9. Расчеты**

При цитохимических реакциях необходимо определить характер цитохимических реакций: слабая, умеренная, интенсивная, с указанием процента положительно реагирующих клеток.

С этой целью применяют полуколичественный метод оценки результатов в условных единицах или вычислением среднего цитохимического коэффициента (СЦК).

Принцип его заключается в оценке интенсивности окраски и числа положительных гранул при анализе 100 клеток:

- 0 - отсутствие окраски цитоплазмы расценивается как отрицательная реакция;
- +
- ++ - диффузная окраска цитоплазмы, наличие умеренного числа гранул;
- +++ - интенсивное окрашивание цитоплазмы, многочисленные гранулы, заполняющие всю клетку.

После оценки интенсивности окраски цитохимической реакции проводят расчет результатов в условных единицах или СЦК.

Вычисление среднего цитохимического коэффициента по формуле Astaldi и Verga:  $3xС+2xВ+А$

Оценка результатов в условных единицах по методике Karlow:

$$\text{СЦК} = \frac{3xС+2xВ+А}{100}, \text{ где}$$

А – количество клеток со слабopоложительной реакцией;

В - количество клеток с умеренно положительной реакцией;

С – количество клеток с резко выраженной реакцией.

При этом показатель активности реакций в условных единицах может колебаться от 0 до 300, а СЦК – от 0 до 3%.

#### 10. Условия хранения и эксплуатации.

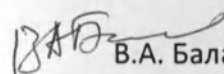
Хранение реагентов при  $t^{\circ} 2-8^{\circ} \text{C}$  в темном месте.

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

По вопросам, касающимся качества набора ДИАХИМ-ЦИТОСТЕЙН-ПАС, следует обращаться в ООО «НПФ АБРИС+» по адресу: 196135, г. Санкт-Петербург, а/я 355; 196143, С.Петербург, пр. Гагарина, 65; тел./факс:(812) 727-24-40, 727-88-18; e-mail: abris@abrisplus.ru; <http://www.abrisplus.ru>. и в Институт государственного контроля лекарственных средств ФГУ «НЦЭСМП» Росздравнадзора по адресу:

117246, г. Москва, Научный проезд, д. 14 А. Тел: (495) 120-60-95, 120-60-96.

Ведущий врач-гематолог  
НИИ Гематологии и трансфузиологии,  
к.м.н

 В.А. Балашова

Директор по производству  
ООО НПФ «АБРИС+»

 С.Н. Горностаев

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической  
лабораторной диагностики  
ГБОУ ДПО РМАПО  
Минздравсоцразвития России,  
д.м.н., профессор

 В.В. Долгов  