

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ 20__ г

№ _____

«Утверждаю»



Генеральный директор
ООО НПФ «АБРИС+»

В.М. Марковский

« 10 » 09 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ЦИТОХИМИЧЕСКОГО

ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ В ЛЕЙКОЦИТАХ

(ДИАХИМ-ЦИТОСТЕЙН-МПО)

1. Назначение

Набор предназначен для цитохимического определения миелопероксидазы в лейкоцитах в клинично-диагностических лабораториях лечебно - профилактических учреждений.

Пероксидазная реакция (определение активности миелопероксидазы) используется для выявления миелоидных клеточных элементов. Вместе с ШИК-реакцией и реакцией на неспецифическую эстеразу, миелопероксидаза является одним из основных цитохимических методов для дифференциальной диагностики острых лейкозов.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип метода

Пероксидаза является ферментом - лизосомальной каталазой, катализирующей в присутствии перекиси водорода окисление различных субстратов. При окислении ортотолидина, используемых в реакциях, образуются интенсивно окрашенные соединения, в том случае, если в клетке присутствует пероксидаза, при взаимодействии с которой перекись водорода разрушается с выделением кислорода, который и окисляет ортотолидин, переводя их в окрашенные соединения

2.2. Состав набора

- Орто-толидин – 12 флаконов (по 0,05 г)
- Краситель азур-эозин по Романовскому - 1 флакон (50 мл);
- Перекись водорода – 1 флакон (10 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 крови здоровых людей 3- 16% нейтрофилов окрашены резко положительно, 60-90% положительно, остальные – слабо положительно. СЦК нейтрофилов здоровых людей равен $2,56 \pm 0,033$.

Реакция используется с целью диагностики острых лейкозов. При острых миелобластных лейкозах активность фермента в бластах варьирует от умеренной до выраженной, при острых монобластных – слабая, при острых лимфобластных – отрицательная. Миелопероксидаза выявляется в виде гранул желтого цвета в цитоплазме клеток.

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-эпидемиологических 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.

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 о-толидина

Растворить содержимое одного флакона орто-толидина в 3мл 96% этилового спирта и долить 2мл дистиллированной воды. Хорошо взболтать и **перед употреблением** добавить пипеткой 1 каплю 3% перекиси водорода.

7.2.2. Приготовление рабочего раствора красителя азур-эозин по Романовскому

Краситель азур-эозин по Романовскому разбавить дистиллированной водой в соотношении 1:10.

Рабочий раствор красителя азур-эозин по Романовскому стабилен при комнатной температуре в течение 8 часов.

7.2.3. Реагенты готовые к применению:

-перекись водорода

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 15 секунд, 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 с только что добавленной в него 3 % перекисью водорода. Оставить на 15- 20 минут при комнатной температуре.

Промыть дистиллированной водой в течение 10 секунд и промокнуть фильтровальной бумагой. Докрасить рабочим раствором красителя Диахим-Гемистейн-Р 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:

Миелопероксидаза выявляется в виде гранул желтого 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;
- + - слабодиффузное окрашивание или единичные гранулы в цитоплазме;
- ++ - 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: $3xС+2xB+A$

Оценка результатов в условных единицах по методике Karlow:

$$\text{СЦК} = \frac{3xС+2xB+A}{100}, \text{ где}$$

A – количество клеток со слабopоложительной реакцией;

B - количество клеток с умеренно положительной реакцией;

C – 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.

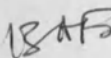
Хранение реагентов при $t^{\circ} 2-8^{\circ} \text{C}$ в темном месте.

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

По вопросам, касающимся качества набора ДИАХИМ-ЦИТОСТЕЙН-МПО, 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
11-12

Прошито и пронумеровано

5 (1476) лист 06

Генеральный директор

ООО «НПО «АБРИС+»

В.М. Марковский

