

«Утверждаю»

Генеральный директор
ООО «НПФ «АБРИС+»

В.М. Марковский

20/7 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению медицинского изделия для диагностики in vitro
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ЦИТОХИМИЧЕСКОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В ЛЕЙКОЦИТАХ
(ДИАХИМ-ЦИТОСТЕЙН-ЩФ)

ТУ 9398-079-27428909-2016

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для полуколичественного цитохимического определения щелочной фосфатазы в лейкоцитах.

Объекты исследований: кровь, костный мозг.

Область применения – лабораторная диагностика.

Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях лечебно - профилактических учреждений.

Определение активности щелочной фосфатазы применяется для цитохимической дифференциации хронической миелоидной лейкемии от других заболеваний миелопролиферативного типа.

2. ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Набор выпускается в соответствии с требованиями ТУ 9398-079-27428909-2016.

2.2. Состав набора

- А-нафтилфосфат натрия по 0,06 г - 6 фл.
- Прочный синий РР по 0,04 г - 6 фл.
- Пропандиоловый буфер 100 мл - 1 фл.
- Метилловый зеленый 2 г - 1 фл.

2.3. Компоненты набора в указанных дозировках расфасованы во флаконы из полипропилена или полиэтилена высокого давления с пластмассовой винтовой крышкой, и винтовой пластмассовой пробкой поступающих в комплекте с флаконом вместимостью 10 и 100 мл соответственно.

2.4. Контроль качества набора предусматривает:

2.4.1. Определение органолептических и физико-химических показателей: согласно ГОСТ Р ЕН 13612 « Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro ».

Для контроля качества использовать доступные контрольные материалы!

2.4.2. Показатели чувствительности и стабильности.

Чувствительность выявления щелочной фосфатазы в лейкоцитах – соответствие результатов определения набором ДИАХИМ-ЦИТОСТЕЙН-ЩФ требованиям рабочей панели предприятия (РПП 002.010.14), аттестованной ОБТК ООО «НПФ «АБРИС+» – составляет 100%: в мазках №№1 – 10 щелочная фосфатаза в лейкоцитах не выявлена, СЦК = 0,00 для мазков №№1 – 10.

Окраска щелочной фосфатазы в лейкоцитах – гранулы коричневого цвета.

2.4.3. Показатели специфичности.

Специфичность выявления щелочной фосфатазы в лейкоцитах – соответствие результатов определения набором ДИАХИМ-ЦИТОСТЕЙН-ЩФ требованиям рабочей панели предприятия (РПП 002.010.14), аттестованной ОБТК ООО «НПФ «АБРИС+» – составляет 100%: в мазках №№11 – 25 щелочная фосфатаза в лейкоцитах выявлена, СЦК $\geq 0,01$ для мазков №№11 – 25.

2.4.4. Аналитические и диагностические характеристики набора.

Цитохимические исследования проводят в мазках крови, костного мозга. 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.

2.4.5. Принцип метода.

В основе лежит метод азосочетания – расщепление щелочной фосфатазой альфа-нафтилфосфата с освобождением альфа-нафтола, образующего с солями диазония нерастворимый окрашенный в коричневый цвет осадок в местах локализации фермента.

2.5. Комплект поставки: набор, инструкция по применению, паспорт качества.

Набор рассчитан на проведение 12 определений при расходе 1,0 мл рабочего реагента на один анализ.

3. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

При использовании по назначению и в соответствии с настоящей инструкцией противопоказаний к применению набора нет.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.1 Только для профессионального применения.

4.2 Набор предназначен только для диагностики in vitro.

4.3 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными и вредного воздействия на организм оператора не оказывают.

4.4 Компоненты набора во время производства и эксплуатации не являются источником опасных излучений и выделений вредных веществ, загрязняющих окружающую среду выше установленных норм по ГОСТ 12.1.005.

4.5 При работе с компонентами набора следует соблюдать меры предосторожности:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами тщательно вымыть руки водой с мылом.

При попадании компонентов набора на кожу или слизистую оболочку следует пораженные участки промыть большим количеством воды. При проглатывании следует выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

4.6 При работе с анализируемым материалом необходимо соблюдать меры предосторожности, предусмотренные внутрилабораторной инструкцией по технике безопасности и, так как сыворотка и плазма крови человека являются потенциально инфицированным материалом,

способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемио-логических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

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;
- делительная воронка;
- таймер;
- чашки Петри;
- бумага фильтровальная;
- вода дистиллированная;
- масло иммерсионное;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- пипетки.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

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

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

Следует помнить о контроле, т.е. при слабой реакции или её полном отсутствии обязательно искать в мазке хотя бы 1-2 отчетливо окрашенные клетки.

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 тонкий, 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 0,05 М буферного раствора:

К содержимому флакона маточного раствора пропандиолового буфера добавить 70 мл дистиллированной воды (проверить pH 9,6 – 9,7), при необходимости добавить 3,5 мл 0,1н соляной кислоты. Хранить в холодильнике.

7.2.2 Приготовление 2% раствора метилового зеленого:

Содержимое флакона метилового зеленого растворить в 100 мл дистиллированной воды и вылить в делительную воронку. В ту же воронку залить 50 мл хлороформа. Смесь взболтать несколько раз в течение дня и оставить на ночь для экстрагирования метилового фиолетового. Краска «метилловый зеленый» нестойка, под влиянием света и кислорода воздуха часть метилового зеленого превращается в метиловый фиолетовый, который должен быть экстрагирован хлороформом и удален.

7.2.3 Рабочий раствор:

Содержимое флакона с альфа-нафтилфосфатом натрия растворить в 5 мл 0,05М буферного раствора по 7.2.1 и добавить содержимое флакона прочного синего РР. Хорошо перемешать. Готовится перед употреблением и фильтруется прямо на стекла. Рабочий раствор стабилен в течение 15 минут. Раствор имеет красно-коричневый цвет и быстро становится мутным, но мутность не влияет на окраску.

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 течении 20 секунд, после чего промыть проточной водой в течение 10 секунд.

7.3.2. Окраска препаратов

Непосредственно на мазок через воронку с фильтровальной бумагой нанести столько рабочего раствора 7.2.3, чтобы мазок был покрыт полностью. Оставить для реакции на 15 минут. Промыть мазки в проточной воде 1 минуту.

Докрасить мазки 2% водным раствором метилового зеленого в течение 15 мин.

Промыть мазки в проточной воде 1 минуту.

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

Микроскопировать с иммерсионной системой.

7.4. Результаты окраски:

Щелочная фосфатаза выявляется в виде гранул коричневого цвета в цитоплазме лейкоцитов.

7.5. Учет результатов реакции:

Для учета результатов анализа используется полуколичественная оценка результатов, основанная на принципе Астальди. Для этого оценивается 100 нейтрофилов с сегментоядерным ядром. Подсчет производится с указанием количества положительно реагирующих клеток, а соответствие степени окраски учитывает следующие 4 степени активности цвета:

- 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 вычислением среднего цитохимического коэффициента (СЦК).

$$\text{Условные единицы} = 3 \times C + 2 \times B + A \quad (1),$$

где: А – количество клеток со слабopоложительной реакцией;

В – количество клеток с умеренно положительной реакцией;

С – количество клеток с резко выраженной реакцией.

$$\text{СЦК} = \frac{3 \times C + 2 \times B + A}{100} \quad (2),$$

где: А – количество клеток со слабopоложительной реакцией;

В – количество клеток с умеренно положительной реакцией;

С – количество клеток с резко выраженной реакцией.

Нормальные показатели – СЦК от 0,25 до 1,00.

Сниженный индекс характерен для активной фазы ХМЛ. Лишь гемолитическая и железодефицитная анемии или некоторые вирусные заболевания показывают сравнительно низкий индекс. Нормальные и повышенные цифры требуют идентификации. ХМЛ в ремиссии может продуцировать нормальную или даже повышенную ЩФ.

Клиническое значение

Наибольшее диагностическое значение имеет определение активности фермента при гемобластозах; снижение активности характерно для хронического миелолейкоза, повышение — рассматривают как один из признаков эритремии. Повышение активности наблюдается также при воспалительных процессах, интоксикациях, опухолях, коллагенозах, циррозах печени. Показатель может быть использован как дифференциально-диагностический признак при лейкомоидных реакциях (активность фермента повышена) и хроническом миелолейкозе. Снижение активности фермента часто сопутствует вирусному гепатиту, инфекционному мононуклеозу и другим вирусным инфекциям, лучевой болезни.

8. ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.

При транспортировании и хранении набора должны соблюдаться условия, обеспечивающие сохранность его исходного качества, обеспечиваться защита от воздействия температуры окружающей среды, от повреждения упаковок и т.д. (СП 3.3.2.1248-03, СП 3.3.2.2329-08, изменения №1; п.4.1)

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

Транспортирование набора производится всеми видами крытых транспортных средств, в соответствии с требованиями и правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта, при температуре $+2 - +8^{\circ}\text{C}$.

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя в крытых вентилируемых помещениях, не допуская воздействия прямых солнечных лучей, при температуре $+2 - +8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

Срок годности набора в упаковке производителя – 1 год со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

В процессе использования набора:

1. 2% раствор метилового зеленого, хранение не более 7 суток при $t = 2-8^{\circ}\text{C}$;

2. Рабочий раствор всегда свежеприготовленный, не хранится, стабилен 15 минут.

Наборы с истекшим сроком годности, а также бракованные наборы использованию не подлежат.

9. УТИЛИЗАЦИЯ

Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации (ГОСТ Р 51088).

Наборы не прошедшие контроль, а также серии с истекшим сроком годности. Класс опасности отходов согласно СанПиН 2.1.7.2790-10 – класс А.

Сбор отходов класса А – согласно п.4.6 и 4.7 СанПиН 2.1.7.2790-10.

Хранение отходов класса А – согласно п. 6.5 СанПиН 2.1.7.2790-10.

Транспортирование отходов класса А – согласно п.7.1-7.4 СанПиН 2.1.7.2790-10.

Биологические образцы, полученные в ходе лабораторных тестов с использованием компонентов набора. Класс опасности отходов согласно СанПиН 2.1.7.2790-10 – класс Б. Сбор отходов класса Б – согласно п.4.11 - 4.19 СанПиН 2.1.7.2790-10. Обеззараживание отходов класса Б – согласно разделу V СанПиН 2.1.7.2790-10. Обеззараженные отходы класса Б могут накапливаться, временно храниться, транспортироваться, уничтожаться и захораниваться совместно с отходами класса А. Упаковка обеззараженных медицинских отходов класса Б должна иметь маркировку, свидетельствующую о проведенном обеззараживании отходов.

10. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных настоящими техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора ДИАХИМ-ЦИТОСТЕЙН-ЩФ, следует обращаться в ООО «НПФ «АБРИС+» по адресу: 196084, г.Санкт-Петербург, ул. Цветочная, д.16, лит. М, 2-й этаж. Тел./факс: 8-800-1000-422 (бесплатный по России), тел.: 8(812) 458-44-07, 458-44-35; e-mail: abris@abrisplus.ru; <http://www.abrisplus.ru>.

Ведущий врач-гематолог

НИИ Гематологии и трансфузиологии

к.м.н



В.А. Балашова

«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

03 MAR 2017



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 6 ЛИСТОВ

« 03 MAR 2017 » 201__ год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Барнавичус Н.К.



Прошито 6 листов
Генеральный директор

Марковский В.М.