

«ПОГОДЖЕНО»

Перший заступник голови Державної
служби України з лікарських засобів

13 липня 2012 р. **І.Б. Демченко**

Код за НК 024:2023 – 44946

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар клінічної лікарні „Феофанія”
Державного управління справами

І.П. Семенів 22 червня 2011р.

ТУ У 24.4-24607793-024:2011

ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ШВИДКОГО ДИФЕРЕНЦІЙНОГО ЗАБАРВЛЕННЯ („ЛЕЙКОФАРБ”)

IVD

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для швидкої диференціальної оцінки гематологічних, цитологічних, цитобактеріологічних мазків, сперми в клініко-діагностичних лабораторіях і науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на відповідну кількість забарвлень:

REF	від	до	REF	від	до
<u>HP030.04</u>	50	200	<u>HP030.13</u>	500	2000

Зберігання набору - при температурі від плюс 15 °С до плюс 25 °С.

Гарантійний термін придатності набору - 24 місяця від дня виготовлення.

Зберігати в захищеному від світла місці.

Набір призначений для застосування *in vitro* професійно навченим лаборантом.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Набір для швидкого диференційного забарвлення - це оптимальна композиція фіксатора і барвників для диференційованого забарвлення клітинних елементів. Використовуючи **Промиваючий розчин** можна гарантувати високу стабільність фарбування та чисті результати забарвлення без преципітації. Швидка процедура фарбування з готовими до роботи розчинами ідеально підходить для використання методу в експрес - лабораторії.

Результат полягає в диференціальному забарвленні клітин у зв'язку з їх цитохімічними характеристиками.

СКЛАД НАБОРУ

- | | |
|---|--|
| 1. Фіксатор | <u>HP030.04</u> - 1 флакон з (100 ± 2) мл;
<u>HP030.13</u> - 1 пляшка з (1000 ± 20) мл; |
| 2. Розчин Червоного барвника | <u>HP030.04</u> - 1 флакон з (100 ± 2) мл;
<u>HP030.13</u> - 1 пляшка з (1000 ± 20) мл; |
| 3. Розчин Синього барвника | <u>HP030.04</u> - 1 флакон з (100 ± 2) мл;
<u>HP030.13</u> - 1 пляшка з (1000 ± 20) мл; |
| 4. Концентрат Промиваючого розчину | <u>HP030.04</u> - 1 флакон з (100 ± 2) мл;
<u>HP030.13</u> - 1 пляшка з (1000 ± 20) мл; |
| 5. Ємності для Промиваючого розчину | <u>HP030.04</u> - 2 пластикових флакона ; |
| 6. Додатково потрібний реактив Імерсійна олія для мікроскопії (REF HP060.01 або REF HP060.02). <u>До складу набору не входить!</u> | |

АНАЛІЗУЄМИЙ МАТЕРІАЛ

Пробопідготовка

Відбір проб повинен проводитися кваліфікованим персоналом. Предметне скло перед дослідженням знежирюють і роблять на ньому мазок. Мазок слід робити тонким, щоб клітини рівномірно розподілялися на поверхні скла і не утворювали скупчень. Використовуйте тонкі, висушені на повітрі мазки крові або кісткового мозку, а також клініко-цитологічні матеріали, що зберігалися не більше трьох діб. Мазки необхідно висушувати на повітрі протягом не менше 30 хв і зафіксувати згідно інструкцій перед фактичною реакцією. Усі зразки мають бути оброблені з використанням найсучасніших технологій. Усі зразки повинні бути чітко марковані. Для взяття проб та їх підготовки необхідно використовувати відповідні інструменти. Дотримуйтесь інструкцій виробника щодо застосування/використання. При використанні відповідних допоміжних реагентів - необхідно дотримуватися інструкцій із застосування.

Мазки крові можна приготувати зі свіжої крові без додавання антикоагулянту або з крові з ЕДТА-антикоагулянтом. Як правило, не слід використовувати гепаринізовану кров (Див. **Джерела Помилки 4**).

Для збереження морфології клітин мазок крові слід готувати відразу після забору або не пізніше трьох годин після відбору.

Якщо зразок крові не можна пофарбувати відразу після приготування мазка або зразка для стиснення, зразок слід ретельно висушити та зафіксувати бажано протягом однієї години за допомогою **Фіксатору**.

Помилковий збір зразків, отримані через шкірні пункції, може знизити якість зразка. Стиснення пальця може розбавити зразок крові тканинною рідиною і таким чином вплинути на склад зразка. Спирт, який використовується як дезінфікуючий засіб перед забором зразка проколом шкіри може спричинити гемоліз, який спотворить результати.

Мазки з кісткового мозку слід готувати зі свіжого або аспірату, зібраного з використанням антикоагулянту (ЕДТО). Мазки кісткового мозку слід досліджувати без затримки, щоб уникнути артефактів, що з'являються при зберіганні.

Щоб уникнути вплив утворення артефактних змін, препарати кісткового мозку повинні бути повністю сухими перед фіксацією.

Цитобактеріологічні зразки (сеча, пунктати, ліквор). Дайте цитологічному мазку висохнути.

Сперма. Додайте **15 мкл** свіжого зразка сперми на одну сторону предметного скла та створіть тонкий і однорідний мазок. Дайте мазку висохнути (мінімум 10 хвилин).

Підготовка придатних високоякісних зразків вимагає особливої уваги (Див. *Література 3 - 6*).

ОБЛАДНАННЯ

1. Раковина або спеціальний місткий лоток для фарбування;
2. Спеціальний штатив («рейки») для фарбування мазків на предметних скельцях;
3. Пінцет або щипці для узяття предметних стекол;
4. Колба мірна на 1000 мл (ГОСТ 1770-74);
5. Дистильована вода;
6. Штатив для просушування забарвлених стекол на повітрі у вертикальному або нахиленому положенні.

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

1. **Розчини 1-3** - готові до використання. Після першого відкриття флакона вміст придатний до закінчення зазначеного терміну придатності за умови зберігання при температурі від плюс 15 °С до плюс 25 °С (Див. *Джерела Помилки 5-7, Примітка 4*).
2. **Промиваючий розчин** – 47 мл **Концентрату промиваючого розчину** перенести у мірну колбу місткістю 1000 мл та довести до мітки дистильованою водою. Розчин стабільний 1 місяць при температурі від плюс 15 °С до плюс 25 °С. Буферний розчин рекомендується готувати за добу до використання. Перенесіть до відповідних ємностей з набору (для **Етапу 2А** та **Етапу 4**).

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Аналіз проводять у відповідності зі схемою представленою в таблиці 1. Предметні стекла необхідно занурювати та перемішувати в розчині, просте занурення саме по собі дає неадекватні результати забарвлення. Щоб уникнути непотрібного перехресного забруднення розчинів, предметні стекла повинні добре стекти після окремих етапів забарвлення (Див. *Примітка 4*).

Таблиця 1

Процедура забарвлення, ЕТАП	Мазків крові	Паразитологічних (Leishmania, Toxoplasma, Microsporadia) та мікробіологічних зразків (Cryptosporidium, Pneumocystis carinii)	Сперми	Цитобактеріологічних зразків (сеча, пунктати, ліквор)
1. Занурте мазок у Фіксатор	5-10 разів по 1 сек	1 хв	5 x 1 сек	5 секунд (Примітка: інкубуйте ліквор протягом більш тривалого періоду часу - 1 хв)
Після кожного занурення дають можливість розчину стікати та його залишок видаляють об край посуду.				
2. Занурте фіксований мазок у Розчин Червоного барвника	3-15 разів по 1 сек	25 сек	5 x 1 сек	3 x 1 сек (ліквор - 2 x 1 сек) Примітка: подовжте інкубаційний період, якщо потрібен сильніший відтінок червоного/фіолетового – 5 x 1 сек
Після кожного занурення дають можливість розчину стікати та його залишок видаляють об край посуду (Див. <i>Примітка 4</i>).				
3. Занурте фіксований мазок у Розчин Синього барвника	3-15 разів по 1 сек	25 сек	5 x 1 сек	6 x 1 сек (ліквор - 2 x 1 сек) Примітка: зменшіть інкубаційний період, якщо потрібен сильніший відтінок червоного/фіолетового 5 x 1 сек
Після кожного занурення дають можливість розчину стікати та його залишок видаляють об край посуду.				

4. Промийте фіксований мазок у Промиваючому розчині	1 хв (з перемішуванням)
5. Предметне скло висушують на відкритому повітрі при кімнатній температурі у вертикальному або нахиленому положенні. Не слід промокати препарат.	

6. Накрійте зріз покривним склом.

Після зневоднення (підвищення рівня спирту) і просвітлення ксилолом (або аналогами) цитологічні зразки можна змонтувати за допомогою безводних монтажних засобів і покривного скла, а потім зберігати.

Результати фарбування можна варіювати, змінюючи процедуру занурення. Наприклад, частіше занурення препарату в **Розчин Червоного барвника**, чим в **Розчин Синього барвника** підвищує інтенсивність забарвлення еозинофільних клітин, а частіше занурення препарату в **Розчин Синього барвника** чим в **Розчин Червоного барвника** підвищує інтенсивність забарвлення базифільних клітин.

Змінюючи процес занурення, ви можете підібрати найбільш відповідну для ваших цілей процедуру. Не занурюйте мазок менше ніж 3 рази. Наприклад для **мазків крові**: 10 разів по 1 сек (**Фиксатор**), 10 разів по 1 сек (**Розчин Червоного барвника**), 5 разів по 1 сек (**Розчин Синього барвника**).

Реагенти можуть використовуватися при забарвленні вручну.

Використання імерсійної олії рекомендується для аналізу пофарбованих предметних стекол із мікроскопічним збільшенням >40х.

ПОКАЗНИКИ НОРМИ

Диференціальний вміст лейкоцитів крові (у дорослих):

Параметр	Частка (у %)
нейтрофільні лейкоцити	40-75
еозинофіли	1-5
базофіли	<1
моноцити	1-10
лімфоцити	20-45

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

При правильному проведенні фарбування чітко виявляються всі відповідні клітини, які набувають індивідуального забарвлення і можуть бути ідентифіковані фахівцями (Див. Таблиця 2).

Для сперми: головка - однорідна темно-фіолетова, акросома - світло-фіолетова, середня частина і хвіст - темно-фіолетові, фон - світло-рожевий.

Таблиця 2

Структура	колір
Еритроцити	рожеві/жовтувато-червоні /рожево-помаранчеві
Тромбоцити	темно-сині/фіолетові/фіолетові гранули
Цитоплазма лімфоцитів	блакитна
Нейтрофіли	ядро синє
	цитоплазма рожева
	гранули фіолетові
Еозинофіли	ядро блакитне
	цитоплазма синя
	гранули червоні /яскраво-помаранчеві / від червоного до червоно-коричневого
Базофіли	ядро темно-синє / фіолетове
	гранули фіолетові / від темно-фіолетового до чорного
Моноцити	ядро фіолетове
	цитоплазма світло-блакитна / сіро-блакитна
Бактерії/мікроорганізми	насиченого синього кольору, різної форми
Паразити крові	червоні (ядра), сині (цитоплазма)
Колаген, цитоплазма та м'язи	різні відтінки рожевого, синього, оранжевого та жовтого

ДЖЕРЕЛА ПОМИЛОК

1. Забруднення проби нормальною мікробною флорою або фарбувальними речовинами можуть порушити фарбування.

2. Нерівномірний розподіл мазків по поверхні предметного скла може привести до неправильного підрахунку клітин.

3. Використовуваний для протирання шкіри етиловий спирт може стати причиною гемолізу і появи артефактів. Не допускайте висихання проби на якій-небудь стадії процедури. Ретельно промивайте пробу для того, щоб уникнути артефактів фарбування. Промивання препаратів необхідно здійснювати тільки у **Промиваючому розчині**. Результати фарбування залежать від рН. Лужне рН підсилює синій, а вміст кислоти – червоні відтінки.

Виробник залишає за собою право вносити зміни без попереднього повідомлення. Дата останньої перевірки **25.12.2024**

4. Гепарин не слід використовувати як антикоагулянт при заборі крові, оскільки він може спричинити посиніння фону.

5. Важливо ретельно закривати пляшку з розчином **Фіксатору** після використання, щоб уникнути поглинання води з вологого повітря та випаровування метанолу. Забруднення **Фіксатору** водою може спричинити світлозаломлюючий «водний артефакт» на предметних стеклах. Неправильна фіксація викликає артефактні осередки задирок. Недостатньо фіксовані клітини лізують і не забарвлюються належним чином.

6. Захистіть **Розчин Синього барвника** та **Розчин Червоного барвника** від замерзання, щоб уникнути утворення осаду. Використовуйте свіжі розчини та уникайте надмірного використання розчинів. Періодично змінюйте фарбувальні розчини в камерах для фарбування, щоб забезпечити оптимальне фарбування. Надмірне використання реагентів може призвести до блілого або занадто синього фарбування. Не змішуйте використані фарбувальні реагенти з невикористаними.

7. Якщо ви спостерігаєте осад у розчині **Фіксатору** у камері для фарбування, негайно замініть його свіжим розчином. Осад може перешкоджати диференціації клітин.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Необхідне застосування спеціального захисного одягу і рукавичок. Необхідно уникати попадання мікроорганізмів в оточуюче середовище. Необхідно ретельно дотримуватися спеціальних інструкцій та техніки безпеки. Проба зразка може містити патогени. Захистіть себе від інфекції відповідно до інструкцій на вашому робочому місці.

Розчин **Фіксатору** є легкозаймистим. Проявляє токсичні властивості і може викликати сильні небезпечні необоротні явища при вдиханні пари, при контакті з шкірою і при заковтуванні. Зберігайте флакони щільно закритими. Забезпечте належну вентиляцію. Не тримайте розчини поблизу джерел займання, не палити. При відчутті нездужання або при нещасному випадку негайно зверніться до лікаря, по можливості пред'явивши йому етикетку фарбників.

ПРИМІТКИ

1. Не витирайте верхню частину предметного скла із зразком, щоб уникнути видалення або знищення клітин.

2. Не дозволяйте зразкам висихати на будь-якому етапі процедури фарбування.

3. Після фарбування слід належним чином промити предметні стекла **Промиваючим розчином**, щоб уникнути артефактів барвника. Будь-які зміни процедури забарвлення або робочих розчинів можуть вплинути на результат забарвлення та підлягають валідації методу.

4. Перенесення **Розчину Червоного барвника** у **Розчин Синього барвника** приведе до погіршення ефективності фарбування з часом через взаємодію між розчинами, що утворюють нерозчинні метиленовий синій/азур – еозинати. Кількість **Розчину Червоного барвника**, що переноситься, повинна бути мінімальною. Предметні стекла можна *швидко* промити в **Промиваючому розчині (ЕТАП 2А)** перед перенесенням у **Розчин Синього барвника**, не впливаючи на ефективність фарбування.

5. Якщо слайди зберігатимуться протягом тривалого часу, рекомендується подовжити період фіксації (пункт 1 Таблиці 1) до 1-2 хв.

УТИЛІЗАЦІЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і спільно з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

Паперову упаковку здайте в макулатуру, виполоскану тару в сортоване сміття.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bezrukov AV. Romanowsky staining, the Romanowsky effect and thoughts on the question of scientific priority. Biotech Histochem. 2017;92(1):29-35.

2. Horobin RW. 2011. How Romanowsky stains work and why they remain valuable - Including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. Biotechnic&Histochemistry 86(1): 36-51.

3. Bain BJ et al. Dacie and Lewis Practical Haematology, 11th Edition, Churchill Livingstone, Lontoo, 2012.

4. Lee S-H et al. 2008. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. Int. Jnl. Lab. Hem. 30,349–364.

5. Houwen, B. 2002. Blood film preparation and staining procedures. Clin. Lab. Med., 22(1):1-14.

6. Bain, BJ. 2001. Bone marrow aspiration. J Clin Pathol. 54(9):657-63.



ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика»,
Україна, 49051 м. Дніпро, вул. Каштанова, 32
Тел./факс: (056) 747-47-76, 747-45-34
Тел.: (093) 573-75-35, (067) 535-15-73, (095) 168-36-54
E-mail: filiclit@ukr.net <http://www.feliclit.com.ua>