

ІНСТРУКЦІЯ ЩОДО ЗАСТОСУВАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ КЛІНІЧНОГО АНАЛІЗУ СПИННОМОЗКОВОЇ РІДИНИ (НАБІР «СМР СКРИН»)

IVD

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для визначення цитозу, якісного визначення загального білка та глобулінів у спинномозковій рідині в клініко-діагностичних лабораторіях і науково - дослідницькій практиці.

Набір розрахований на відповідну кількість проведення **аналізів**.

REF	цитоз	реакція Панді	реакція Нонне– Апельта	REF	цитоз	реакція Панді	реакція Нонне– Апельта
<u>HP058.01</u>	200	200	200	<u>HP058.03</u>	20 000	-	-
<u>HP058.02</u>	2000	-	-				

Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Гарантійний термін придатності набору - 12 місяців від дня виготовлення.

Унікати влучення прямих сонячних променів!

Набір призначений для застосування *in vitro* тільки кваліфікованим лабораторним персоналом.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Клітинний склад (цитоз). Реактив Самсона запобігає цитолізу клітин у змішувачі протягом декількох годин. Оцтова кислота, що міститься в реактиві, розчиняє еритроцити, фуксин забарвлює ядра клітин (лейкоцитів) в інтенсивний червоний колір, що полегшує рахунок клітин та їх диференціювання ².

Білок загальний (Див. *Примітку 1*). Якісна реакція Панді: білок із розчином фенолу дає помутніння, інтенсивність якого залежить від вмісту білка.

Глобуліни. Якісна реакція Нонне–Апельта. При взаємодії глобулінів з насиченим розчином сірчаноокислого амонію з'являється помутніння, інтенсивність якого залежить від вмісту глобулінів (осаджуються такі білкові фракції, які залишаються не осадженими в реакції Панді).

СКЛАД НАБОРУ

- | | |
|--|--|
| 1. Реактив Самсона | <u>HP058.01</u> – 1 флакон з (10,0 ± 0,1) мл |
| | <u>HP058.02</u> – 1 флакон з (100 ± 2) мл |
| | <u>HP058.03</u> – 1 флакон з (1000 ± 20) мл |
| 2. Фенол | <u>HP058.01</u> – 1 флакон з (2,5 ± 0,1) г |
| 3. Амоній сірчаноокислий | <u>HP058.01</u> – 1 пакет з (85,0 ± 0,5) г |
| 4. Додатково (Див. <i>Примітку 1</i>) | Набір реактивів «Загальний білок-УЛ» <u>HP010.02</u> |

АНАЛІЗУЄМИЙ МАТЕРІАЛ

СМР. Спинномозкова рідина, одержана при люмбальній пункції або пункції шлуночків мозку. Стабільна за кімнатної температури не більше 1 години.

ОБЛАДНАННЯ

- 1 Мірний циліндр ємністю 25,0 мл та 100,0 мл;
- 2 Мірна колба ємністю 500,0 мл;
- 3 Піпетки, що дозволяють відбирати обсяги рідини від 0,2 мл до 1,0 мл та 5,0 мл;
- 4 Предметні скельця;
- 5 Пінцет або щипці для взяття предметних стекол;
- 6 Секундомір;
- 7 Камера Фукса-Розенталя чи Горяєва;
- 8 Дистильована вода;
- 9 Термостат, який підтримує температуру (плюс 37 ± 1) °С;

- 10 рН-метр;
- 11 Змішувач для лейкоцитів або годинникове скло;
- 12 Мікроскоп;
- 13 Колба конічна місткістю 200 мл;
- 14 Скляні пробірки місткістю 10 мл;
- 15 Розчин аміаку, 10%;
- 16 Рукавички гумові.

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

1 Реактив Самсона. Готовий до застосування. Реактив можна зберігати в щільно закритих флаконах в темному місці при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С протягом року.

2 Приготування реактиву Панді. До вмісту флакона з реагентом 2 додати 25 мл дистильованої води, перемішати і помістити в термостат при 37°С на добу. Протягом цього часу рідину потрібно кілька разів перемішати. Далі реактив залишити на 1 добу при кімнатній температурі від плюс 18 °С до плюс 25 °С. Прозора надосадова рідина є реактивом Панді.

Реактив стабільний при зберіганні за кімнатної температури від плюс 18 °С до плюс 25 °С протягом року. При зниженні температури реактив каламутніє, при підігріванні просвітлюється і стає придатним для використання.

3 Приготування реактиву Нонне Апелъта.

Вміст пакета з амонію сірчаноокислим перенести до конічної колбу місткістю 200 мл, розчинити у **100 мл** дистильованої води при кип'ятінні. Отриманий розчин витримати протягом 12 годин при кімнатній температурі та відфільтрувати. Приготовлений розчин повинен мати рН 7,0-7,1, тому його слід підлужити 10% розчином аміаку, обережно додаючи по краплях (3 краплі). Реактив Нонне Апелъта можна зберігати за кімнатної температури від плюс 18 °С до плюс 25 °С протягом року.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Визначення цитозу

Спинномозкову рідину ретельно розмішати протягом **2 хв**, потім змішати у змішувачі для лейкоцитів із реактивом Самсона. До першої мітки набрати реактив, до другої мітки набрати спинномозкову рідину. Змішувач струсити і залишити на **10-15 хв** для забарвлення клітинних елементів. Якщо змішувача немає або дуже мало рідини, допускається змішування спинномозкової рідини з реактивом Самсона у співвідношенні: 10 крапель СМР і 1 крапля реактиву. Забарвлену рідину інтенсивно струсити, вилити із змішувача перші 1-2 краплі і потім заповнити лічильну камеру. Найбільш зручна камера Фукса-Розенталя. Заповнену камеру залишити в горизонтальному положенні на **1 хв** для осідання клітинних елементів.

Підрахунок клітин: не змінюючи горизонтальне положення, камеру помістити на столик мікроскопа. Підрахунок клітин робити у всій сітці при малому збільшенні мікроскопа (окуляр 15х, об'єктив 8х). При дуже великій кількості клітин допускається підрахунок половини сітки з наступним множенням результатів на 2

Облік результатів:

- *Камера Фукса-Розенталя:* кількість клітин на 1 мкл розрахувати за формулою (1):

$$X = \frac{A \times 11}{3,2 \times 10}, \text{ де} \quad (1)$$

- А – кількість клітин у всій камері;
- 3,2 – об'єм камери, мкл;
- 11/10 - ступінь розведення спинномозкової рідини реактивом Самсона.

• *Камера Горяєва:* при використанні камери Горяєва для отримання точнішого результату необхідно рахувати не менше 3 камер, взявши потім середнє арифметичне значення.

Кількість клітин на 1 мкл розрахувати за формулою (2):

$$X = \frac{A \times 11}{0,9 \times 10}, \text{ де} \quad (2)$$

- А – кількість клітин у всій камері;
- 0,9 – об'єм камери, мкл;
- 11/10 - ступінь розведення спинномозкової рідини реактивом Самсона.

2. Визначення загального білка (реакція Панді)

На предметне скло налити 2 краплі реактиву Панді, збоку помістити 1-2 краплі спинномозкової рідини, так щоб обидві рідини змішалися, і через 2 хв візуально на темному тлі врахувати результати реакції.

3.Визначення глобулінів (реакція Нонне – Апелъта)

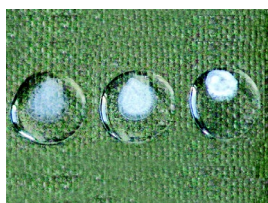
У пробірку внести 0,5 мл реактиву Нонне-Апелъта та 0,5 мл спинномозкової рідини, перемішати. До контрольної (холостої) пробірки внести 1,0 мл води. Через 2 хв візуально врахувати результати реакції, порівнюючи дослідну та контрольну проби на темному тлі. Помутніння спинномозкової рідини через 3 хв і більше не враховується.

Примітка: Реакція Панді тримає в облозі такі білкові фракції, які залишаються неосадженими в реакції Нонне-Апелъта, тому доцільно ставити обидві реакції одночасно.

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Визначення загального білка (реакція Панді)

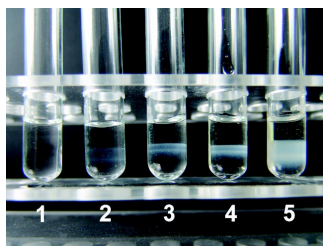
В області зіткнення реактиву та спинномозкової рідини виникає помутніння, вираженість якого залежить від вмісту білка (Див. *Примітку 1*).



Ступінь помутніння позначити хрестами: слабка опалесценція – (+), помітна опалесценція – (++) (Див. *ліворуч*), помірне помутніння – (+++) (Див. *центр*), значне помутніння – (++++). (Див. *правіше*).

Визначення глобулінів (реакція Нонне -Апелъта)

Результат (поява на межі білого кільця) визначають через 2 хв, потім рідину струшують і відзначають інтенсивність помутніння. Мінімальна визначаєма концентрація глобулінів – 0,05 г/л (0,3 г/л загального білка).



Ступінь помутніння позначити хрестами: немає – (-) (Див. 1), слабка опалесценція – (+) (Див. 2), помітна опалесценція – (++) (Див. 3), помірне помутніння – (+++) (Див. 4), значне помутніння – (++++). (Див. 5).

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Клітинний склад (цитоз)

Підвищений цитоз спостерігають при запальних ураженнях мозкових оболонок та органічних ураженнях речовини мозку.

Плеоцитоз при різних захворюваннях ЦНС ¹

Захворювання	Кількість клітин (× 10 ⁶ /л)
Гнійний менінгіт	2000-5000
Абсцеси мозку, актиномікоз	1000–2000
Туберкульозний менінгіт (гостра стадія)	100–500
Серозний менінгіт	100–300
Нейросифіліс	50–500
Енцефаліти	30–300
Ішемічний інсульт	10–200
Пухлини ЦНС	10–60
Розсіяний склероз	3–50

Білок загальний

Підвищення вмісту білка відзначають при порушенні гемодинаміки, запальних процесах, органічних ураженнях ЦНС і оболонок мозку. Знижений вміст білка спостерігається при гідроцефалії та гіперсекреції СМР.

Концентрація загального білка (г/л) у люмбальному лікворі (за Fishman, 1980) ¹

Діагноз	Середні величини (г/л)	Межі вагань (г/л)
Спінальні пухлини	4,25	0,40-36,0
Гнійний менінгіт	4,18	0,21-22,0
Мозкова геморагія	2,70	0,19-21,0
Туберкульозний менінгіт	2,00	0,25-11,4
Мозкові пухлини	1,15	0,15-19,2
Мозкова травма	1,00	0,10-18,2
Асептичний менінгіт	0,77	0,11-4,00

Поліневрит	0,74	0,15-14,3
Мікседема	0,71	0,30-2,42
Поліомієліт	0,70	0,12-3,66
Мозковий абсцес	0,69	0,16-2,88
Нейросифіліс	0,68	0,15-42,0
Уремія	0,57	0,19-1,43
Мозковий тромбоз	0,46	0,17-2,67
Розсіяний склероз	0,43	0,13-1,33
Гостра алкогольна інтоксикація	0,32	0,13-0,88
Епілепсія (ідіопатична)	0,31	0,07-2,00

Глобуліни

Збільшення глобулінової фракції спостерігається при крововиливах у мозок, пухлинах, менінгітах, прогресивному паралічі, розсіяному склерозі. Домішка крові завжди дає позитивні глобулінові реакції.

Клінічний діагноз повинен встановлюватися на основі інтеграції клінічних і лабораторних даних.

РЕФЕРЕНТНІ ВЕЛИЧИНИ

Цитоз у люмбальному лікворі		Цитоз
- у дорослих – 2-4x10 ⁶ /л	- 1-2 роки - 11-14x10 ⁶ /л	- велика цистерна – 0-1x10 ⁶ /л
- у дітей віком до 3 міс. - 20-25x10 ⁶ /л	- 2-5 років - 10 - 12x10 ⁶ /л	- у вентрикулярному лікворі – 0-1x10 ⁶ /л
- 3 міс. - 1 рік – 14-20x10 ⁶ /л	- старше 10 років – 2-6x10 ⁶ /л	- у субокципітальному – 2-3x10 ⁶ /л

Концентрації білка (Див. *Примітку 1*):

- при люмбальній пункції – 0,22-0,33 г/л;
- при вентрикулярній пункції – 0,12-0,20 г/л;
- при цистернальній пункції - 0,10-0,22 г/л;
- у новонароджених – 0,6-0,9 г/л.

Дані величини орієнтовні, відповідно до правил GLP (Належної Лабораторної Практики) рекомендується визначення власних нормальних величин в кожній лабораторії, характерних для обстежуваного контингенту.

ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. Роботи з компонентами набору повинні виконуватись в приміщеннях обладнаних витяжною вентиляцією, в гумових рукавичках, подалі від відкритого вогню.
2. При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.
3. До складу набору входять токсична речовина фенол, реагент Самсона містить оцтову кислоту. При роботі з ним слід бути обережними і не допускати попадання на шкіру і слизові; при попаданні негайно промити уражене місце великою кількістю проточної води. При випадковому попаданні всередину шлунку - випити 0,5 л води та промити шлунок.

УТИЛІЗАЦІЯ

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

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

ПРИМІТКИ

1. Кількісне визначення загального білка у лікворі можна провести, використовуючи набір реактивів «Загальний білок-УЛ» **HP010.02**

ЛІТЕРАТУРА

1. Цветанова Е М. Ликворология. — Киев: Здоровье, 1986. — 372 с.
2. Chu Su, Yu, Atlas of Clinical Microscopy, Second Edition (2011). ISBN-13:978-957-41-8579-5, Author self publishing.



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: filicit@ukr.net <http://www.felicit.com.ua>