



Т. Ю. Гашенко
2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ Клиника-СМЖ

1. Назначение

Набор реагентов предназначен для определения цитоза, качественного и количественного определения общего белка и качественного определения глобулинов в спинномозговой жидкости в клинично-диагностических лабораториях.

Набор рассчитан на анализ 200 проб спинномозговой жидкости.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип метода

Клеточный состав (цитоз)

Реактив Самсона предотвращает цитолиз клеток в смесителе в течение нескольких часов. Уксусная кислота, которая содержится в реактиве, растворяет эритроциты, фуксин окрашивает ядра клеток в интенсивный красный цвет, что облегчает счет клеток и их дифференцирование.

Белок общий

Качественная реакция Панди

Белок с раствором фенола дает помутнение, интенсивность которого зависит от содержания белка.

Количественное определение общего белка в реакции с сульфосалициловой кислотой и натрием сернокислым

Белок с сульфосалициловой кислотой и натрием сернокислым дает помутнение, интенсивность которого пропорциональна содержанию белка и определяется фотометрически при длине волны 410 (400-480) нм.

Глобулины

Качественная реакция Нонне – Апелта

При взаимодействии глобулинов с насыщенным раствором сернокислого аммония появляется помутнение, интенсивность которого зависит от содержания глобулинов (осаждаются такие белковые фракции, которые остаются не осаждаемыми в реакции Панди).

2.2. Состав набора

Реагент 1 - реактив Самсона (кислота уксусная, 5,3 моль/л, фенол, 0,22 моль/л, фуксин основной, 2 г/л, спирт этиловый, 18 г/л) – 1 флакон (10 мл).

Реагент 2 - фенол – 1 флакон (2,5 г).

Реагент 3 - кислота сульфосалициловая 2-водная – п/э пакет (30 г).

Реагент 4 - натрий сернокислый – п/э пакет (70 г или 160г).

Реагент 5 - калибровочный раствор общего белка, 10 г/л – 1 флакон (5,0 мл).

Реагент 6 - аммоний сернокислый – п/э пакет (85 г).

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

Клеточный состав (цитоз)

Повышенный цитоз наблюдают при воспалительных поражениях мозговых оболочек и органических поражениях вещества мозга.

Белок общий

Линейная область определения – в диапазоне от 0,1 г/л до 1,5 г/л, отклонение – не более 10 %.

Чувствительность – не более 0,05 г/л.

Коэффициент вариации результатов определения – не более 10 %.

Повышение содержания белка отмечают при нарушении гемодинамики, воспалительных процессах, органических поражениях ЦНС и оболочек мозга.

Пониженное содержание белка наблюдается при гидроцефалии и гиперсекреции СМЖ.

Глобулины

Минимальная определяемая концентрация глобулинов – 0,05 г/л (0,3 г/л общего белка).

Увеличение глобулиновой фракции наблюдается при кровоизлияниях в мозг, опухолях, менингитах, прогрессивного паралича, рассеянного склероза. Примесь крови всегда дает положительные глобулиновые реакции.

Нормальные значения:

Цитоз - Норма в люмбальном ликворе у взрослых – $2-4 \times 10^6$ /л; у детей до 3 мес – $20-25 \times 10^6$ /л; 3 мес. - 1 год – $14-20 \times 10^6$ /л; 1-2 года – $11-14 \times 10^6$ /л; 2-5 лет – $10-12 \times 10^6$ /л; старше 10 лет – $2-6 \times 10^6$ /л; большая цистерна – $0-1 \times 10^6$ /л; в вентрикулярном ликворе – $0-1 \times 10^6$ /л; в субокципитальном – $2-3 \times 10^6$ /л;
Концентрации белка: - при люмбальной пункции – 0,22-0,33 г/л; при вентрикулярной пункции – 0,12-0,20 г/л; при цистернальной пункции – 0,10-0,22 г/л; - у новорожденных – 0,6-0,9 г/л.

4. Меры предосторожности при работе с набором

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

В состав набора входят кислота сульфосалициловая 2-водная, токсичное вещество фенол, реагент 1 содержит уксусную кислоту. При работе с ним следует соблюдать осторожность и не допускать попадания 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.)

5. Оборудование, материалы и реагенты:

- спектрофотометр или фотоэлектроколориметр, длина волны 410 (400-480) нм, кювета с длиной оптического пути 1,0 см;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- таймер;
- рН-метр;
- смеситель для лейкоцитов или часовое стекло;
- камера Фукса-Розенталя или Горяева;
- микроскоп;
- цилиндр мерный 25 мл и 100 мл;
- колба мерная вместимостью 500 мл;
- колба коническая вместимостью 200 мл;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,2 до 1,0 мл и 5,0 мл;
- пробирки стеклянные вместимостью 10 мл;
- стекло предметное;
- вода дистиллированная;
- раствор аммиака, 10 %;
- раствор натрия хлористого (9 г/л NaCl);
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. Анализируемые пробы

Спинномозговая жидкость, полученная при люмбальной пункции или пункции желудочков мозга.

Стабильна при комнатной температуре не более 1 часа.

7. Проведение анализа

7.1. Приготовление рабочих растворов реагентов

7.1.1. Реагент 1 - Реактив Самсона

Готов к применению.

Реагент 1 можно хранить при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ в плотно закрытом флаконе в течение года.

7.1.2. Реактив Панди

К содержимому флакона с реагентом 2 добавить 25 мл воды дистиллированной, перемешать и поместить в термостат при 37°C на сутки. В течение этого времени жидкость необходимо несколько раз перемешать. Далее реактив оставить на 1 сутки при комнатной температуре $(18-25)^\circ\text{C}$. Прозрачная надосадочная жидкость и является реактивом Панди.

7.1.3 Раствор сульфосалициловой кислоты, 0,24 моль/л (6 %)

Содержимое пакета с реагентом 3 количественно перенести в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворить в 400 мл дистиллированной воды и довести объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор реагента 3 можно хранить при комнатной температуре в течение года.

7.1.4. Раствор натрия сернокислого, 0,98 моль/л (14 %)

Содержимое пакета с реагентом 4 количественно перенести в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворить в 400 мл дистиллированной воды и довести объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор реагента 4 можно хранить при комнатной температуре в течение года.

7.1.5. Реагент для количественного определения общего белка

Смешать раствор сульфосалициловой кислоты, 6 % и раствор натрия сернокислого, 14 % в соотношении 1:1.

Готовят непосредственно перед применением, его можно хранить при комнатной температуре не более 8 часов.

7.1.6. Реагент 5 - Калибровочный раствор общего белка, 10 г/л

Готов к применению.

После вскрытия флакона калибровочный раствор можно хранить при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ в плотно закрытом флаконе не более 6 мес.

7.1.7 Насыщенный раствор аммония сернокислого

Содержимое пакета с реагентом 6 перенести в коническую колбу вместимостью 200 мл, растворить в 100 мл дистиллированной воды при кипячении. Полученный раствор выдержать в течение 12 часов при комнатной температуре и отфильтровать. Приготовленный раствор должен иметь pH 7,0-7,1, поэтому его следует подщелочить раствором аммиака, 10 % осторожно добавляя его по каплям (~3 капли).

Насыщенный раствор сернокислого аммония можно хранить при комнатной температуре в течение

7.2. Проведение анализа

7.2.1. Определение цитоза

Спинномозговую жидкость тщательно размешать в течение 2 мин, затем смешать в смесителе для лейкоцитов с реактивом Самсона. До первой метки набрать реактив, до второй метки набрать спинномозговую жидкость. Смеситель встряхнуть и оставить на 10-15 мин для прокрашивания клеточных элементов. Если смесителя нет или жидкости очень мало, допускается смешивание спинномозговой жидкости с реактивом Самсона в соотношении: 10 капель СМЖ и 1 капля реактива.

Окрашенную жидкость интенсивно встряхнуть, вылить из смесителя первые 1-2 капли и затем заполнить счётную камеру. Наиболее удобна камера Фукса-Розенталя. Заполненную камеру оставить в горизонтальном положении на 1 мин для оседания клеточных элементов.

7.2.2. Определение общего белка (реакция Панди)

На предметное стекло налить 2 капли реактива Панди, сбоку поместить 1-2 капли спинномозговой жидкости, так чтобы обе жидкости слились, и через 2 минуты визуально на темном фоне учесть результаты реакции.

7.2.3. Количественное определение общего белка

7.2.3.1. Построение калибровочного графика

Калибровочный раствор общего белка, 10 г/л разбавить раствором натрия хлористого, 9 г/л в следующих соотношениях:

№ п/п	Калибровочный раствор общего белка, 10 г/л, мл	Раствор натрия хлористого, 9 г/л, мл	Концентрация общего белка, г/л
1	0,05	4,95	0,1
2	0,20	4,80	0,4
3	0,30	4,70	0,6
4	0,50	4,50	1,0
5	0,75	4,25	1,5

Приготовить 5 пробирок вместимостью 10 мл. Во все пробирки внести по 5,0 мл реагента для количественного определения общего белка (см. п. 7.1.5.), в каждую пробирку добавить по 0,5 мл раствора общего белка с концентрацией 0,1 г/л, 0,4 г/л, 0,6 г/л, 1,0 г/л и 1,5 г/л (см. п. 7.2.3.1), соответственно. Содержимое пробирок тщательно перемешать, выдержать при комнатной температуре (18-25) °С в течение 10 минут. Измерить оптическую плотность проб против раствора натрия хлористого, 9 г/л при длине волны 410 (400-480) нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см.

Построить калибровочный график, откладывая по оси ординат оптическую плотность проб, а по оси абсцисс – соответствующие им значения концентрации общего белка, указанные в графе 4 таблицы 1.

7.2.3.2. Количественное определение общего белка

Компоненты и анализируемые пробы отмерить в количествах, указанных в таблице 2.

Отмерить, мл	Опытная проба	Контрольная (холостая) проба
Реагент для определения общего белка	5,0	
Спинномозговая жидкость	0,5	0,5
Натрий хлористый (9 г/л)	-	5,0

Содержимое пробирок тщательно перемешать, выдержать при комнатной температуре (18-25) °С в течение 10 минут. Измерить оптическую плотность опытной ($E_{оп}$) пробы против контрольной (холостой) пробы при длине волны 410 (400-480) нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см.

Примечание: При стоянии образцов более 20 минут, возможно уменьшение значения оптической плотности за счет оседания части преципитата. Непосредственно перед измерением пробирку с опытной пробой тщательно встряхнуть.

При использовании кюветы меньшего объема расход реагентов может быть уменьшен при сохранении указанных выше соотношений.

При концентрациях белка более 1,5 г/л пробу следует развести в 2-3 раза раствором натрия хлористого, 9 г/л, повторить определение и полученный результат умножить на разведение.

7.2.4. Определение глобулинов (реакция Нонне – Апелта)

В пробирку внести 0,5 мл насыщенного раствора сернокислого аммония и 0,5 мл спинномозговой жидкости, перемешать. В контрольную (холостую) пробирку внести 1,0 мл воды. Через 2 минуты визуально учесть результаты реакции, сравнивая опытную и контрольную пробы на темном фоне. Помутнение спинномозговой жидкости через 3 минуты и более не учитывается.

Примечание: Реакция Панди осаждает такие белковые фракции, которые остаются неосажденными в реакции Нонне-Апелта, поэтому целесообразно ставить обе реакции одновременно.

8. Регистрация результатов

Подсчет клеток

Не меняя горизонтального положения, камеру поместить на столик микроскопа.

Подсчет клеток производить во всей сетке при малом увеличении микроскопа (окуляр 15х, объектив 8х). При очень большом количестве клеток допускается подсчет половины сетки с последующим умножением результатов на 2.

Определение общего белка (реакция Панди)

В области соприкосновения реактива и спинномозговой жидкости возникает помутнение, выраженность которого зависит от содержания белка.

Количественное определение общего белка

Длина волны: 410 (400-480) нм;

Длина оптического пути: 1,0 см;

Температура анализа: комнатная (18-25) °С;

Измерение: против холостой пробы.

Определение глобулинов (реакция Ноне-Апельта)

Результат (появление на границе белого кольца) определяют через 2 мин, затем жидкость встряхивают и отмечают интенсивность помутнения.

9. Учет результатов

Камера Фукса-Розенталя

Количество клеток в 1 мкл рассчитать по формуле (1):

$$X = \frac{A \times 11}{3,2 \times 10}, \text{ т.е. приблизительно } \frac{A}{3,0} \quad (1),$$

где A – количество клеток во всей камере;

3,2 – объем камеры, мкл;

11/10 – степень разведения спинномозговой жидкости реактивом Самсона.

Камеры Горяева

При использовании камеры Горяева для получения более точного результата необходимо считать не менее 3 камер, взяв затем среднее арифметическое значение.

Количество клеток в 1 мкл рассчитать по формуле (2):

$$X = \frac{A \times 11}{0,9 \times 10}, \text{ или } X = A \times 1,2 \quad (2),$$

где A – количество клеток во всей камере;

0,9 – объем камеры, мкл;

11/10 – степень разведения спинномозговой жидкости реактивом Самсона.

Реакция Панди

Степень помутнения обозначить крестами: слабая опалесценция - (+), заметная опалесценция – (++) , умеренное помутнение – (+++), значительное помутнение – (++++).

Количественное определение общего белка

Расчет провести по калибровочному графику.

Реакция Ноне-Апельта

Реакцию выразить плюсами (как в реакции Панди).

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности. Допускается хранение при температуре до 25 °С не более 20 суток.

Срок годности набора – 1 год.

Реактив Самсона после вскрытия флакона можно хранить при температуре (2-8) °С в плотно закрытом флаконе не более 1 года.

Реактив Панди можно хранить при комнатной температуре (18-25) °С не более 1 года. При снижении температуры реактив мутнеет, при подогревании просветляется и становится пригодным к использованию.

Раствор сульфосалициловой кислоты, 6 % можно хранить при комнатной температуре не более 1 года

Раствор натрия сернокислого, 14 % можно хранить при комнатной температуре не более 1 года

Насыщенный раствор аммония сернокислого можно хранить при комнатной температуре (18-25) °С не более 1 года.

Калибровочный раствор общего белка после вскрытия флакона можно хранить при температуре (2-8) °С в плотно закрытом флаконе не более 6 месяцев.

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

По вопросам, касающимся качества набора «Клиника-СМЖ», следует обращаться по адресу 142530, Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, 1а АО «ЭКОлаб»; тел/факс (49643) 3-30-93, 3-30-85 – отдел сбыта.

Директор АО "ЭКОлаб"



С.Г.Марданлы