



ГЕМСТАНДАРТ
ПРОИЗВОДСТВО РЕАГЕНТОВ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набора реагентов для цитохимического определения кислой фосфатазы в лейкоцитах

«ГЕМСТАНДАРТ-КФ»

Активность кислой фосфатазы выявляется в большинстве гемопозитических ядродержащих клеток. Положительная окраска проявляется в плазматических клетках, моноцитах, тромбоцитах, Т-лимфоцитах и особенно бластных клетках при Т-клеточном лимфобластном лейкозе, плазмцитоме, ВКЛ. Среди клеток миелоидного ряда наибольшая активность КФ выявляется в гранулоцитарных предшественниках, тогда как зрелые гранулоциты отличаются крайне низкой активностью КФ, вплоть до отрицательной реакции. Особое значение имеет определение активности КФ для дифференциальной диагностики острых лейкозов, злокачественных лимфом, миеломной болезни, ВКЛ.

Принцип реакции:

Кислая фосфатаза включает ряд изоферментов, обладающих общим свойством - способностью освобождать фосфат из спиртовых или фенольных фосфомоноэфиров в кислой среде. Цитохимическое выявление кислой фосфатазы в световом микроскопе основано на образовании нерастворимого окрашенного преципитата в местах, где происходит гидролиз субстрата, который катализирует кислая фосфатаза.

Реагенты:

1. вошедшие в набор:

- Нафтол-AS-фосфат -12 фл.
- Диметилформаид -1 фл.
- Ацетат Na -1 фл.
- Парарозанилин -1 фл.
- Азотистокислый Na -1 фл.
- Тартрат натрия -1 фл.

Набор обеспечивает 12 исследований

2. не вошедшие в набор:

- Фиксирующая смесь (10% спиртовой раствор формалина или 40% формалин)

Приготовление фиксатора (10% спиртовой раствор формалина):

1 мл 40% формалина смешивают с 9 мл 96° этилового спирта. Как прозрачный, так и мутный, молокообразный раствор формалина одинаково пригодны. Полученный 10% раствор формалина хранится в холодильнике.

- Дистиллированная вода;
- 96° этанол;
- Краситель «Гемстандарт-ГММ» (гематоксилин Майера)

Подготовка к анализу:

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.

Приготовление рабочего раствора:

Приготовление ацетатного буфера. Содержимое флакона ацетата Na растворить в колбе (емкостью 500 мл) в 500 мл дистиллированной воды, охладить.

А. Растворить содержимое одного флакона нафтол-AS-фосфата в 0,5 мл диметилформамида, долить 40 мл холодного ацетатного буфера.

Приготовление 4% раствора азотистокислого Na.

Содержимое флакона с азотистокислым Na растворить в 10 мл дистиллированной воды.

Б. В отдельной небольшой посуде (пробирке) смешать 8 капель парарозанилина и 8 капель 4 % раствора азотистокислого Na.

Рабочий раствор:

Раствор А слить с раствором Б. Тщательно смешать, отфильтровать. Измерить рН с помощью рН-метра (в соответствии с инструкцией к прибору). рН раствора должен быть 5,2-5,4. При рН больше 5,4 раствор подкислить несколькими каплями 1 N HCl. Профильтровать.

Ход реакции:

1. Сухие мазки крови или костного мозга фиксировать в парах формалина во влажной камере.

Для фиксации мазки помещают в чашку Петри на стеклянные палочки так, чтобы мазки не касались лежащей на дне чашки ваты или марли, смоченной 40% формалином. Чашку накрывают крышкой.

Время: 30 сек.

Или в 10% спирт — формалиновой смеси.

Сухие мазки крови или костного мозга поместить для фиксации в ёмкость с 10% раствором формалина на этиловом спирте.

2. Промыть проточной водой

Время: 60 сек. Хорошо высушить.

3. Поместить в свежеприготовленный рабочий раствор (в ёмкость Хеллендахела, вертикально, во избежание образования преципитата на стекле).

Инкубировать в темноте при $t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$.

Время: 2-3 часа.

4. Промыть дистиллированной водой и промокнуть фильтровальной бумагой

Время: 10 сек.

5. Докрасить ядра гематоксилином Майера. Поместить препараты в ёмкость для окраски мазков (Хеллендахела) заполненную гематоксилином Майера и производить окраску в течение 15 мин.

6. Промыть стекла в проточной воде

Время: 10 сек.

7. Высушить.

Процедура ингибции реакции КФ тартратом Na:

При необходимости проведения реакции с тартратом Na готовится 2 части рабочего раствора. В одной части ведется окраска на выявление активности КФ, в другой выявляется ингибция реакции тартратом Na. Во вторую половину добавляют тартрат Na из расчета 300 мг реактива на 40 мл рабочего раствора и инкубируют мазки в этой среде в ёмкости Коплина параллельно с инкубацией в свободной от тартрата среде. Тартрат ингибирует реакции в нормальных клетках крови и костного мозга. Патологические клетки при ВКЛ тартратрезистентны.

Реакция имеет диагностическое значение при моноцитарных лейкозах, когда имеет место ингибция реакции в лейкозных монобластах, что важно для дифференцировки миелобластных и монобластных острых лейкозов.

Примечание:

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.

Препараты фиксируют сразу после высушивания на воздухе.

Нефиксированные мазки могут храниться в темноте в течение 3 недель.

Результаты окраски:

Активность кислой фосфатазы выявляется в виде гранул ярко-красного цвета в цитоплазме лимфоцитов и диффузно-гранулярного окрашивания в моноцитах и гранулоцитах. Т-лимфоциты содержат единичные крупные гранулы кислой фосфатазы, в не-Т-лимфоцитах реакция отрицательная, либо мелкогранулярная.

Меры предосторожности.

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 следует одевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В, или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

По вопросам качества *Набора для цитохимического определения кислой фосфатазы в лейкоцитах «ГЕМСТАНДАРТ-КФ»*, следует обращаться в ООО «ГЕМСТАНДАРТ» по адресу: 196641, г. Санкт-Петербург, пос. Металлострой, промзона «Металлострой», дорога на Металластрой д.5 лит.А.

Тел. (812) 46-46-144, e-mail: gemstandart@mail.ru