

Количество определяемых общезо 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 Нюне-Апельля)  
 Реагенты (попадание на границе белого кольца) определяют через 2 мин, затем жидкость взвешивают и отмечают интенсивность помутнения.

**9. Учет результатов**

Камера Фурса-Розенталя  
 Количество клеток в 1 мл рассчитать по формуле (1):

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

где А – количество клеток во всей камере;  
 3,2 – объем камеры, мкл;

11/10 – степень разведения спинномозговой жидкости реактивом Самсона

Камера Горнава

При использовании камеры Горнава для получения более точного результата необходимо считать не менее 3 камер, взяв затем среднее арифметическое значение.  
 Количество клеток в 1 мл рассчитать по формуле (2):

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

где А – количество клеток во всей камере;  
 0,9 – объем камеры, мкл;

11/10 – степень разведения спинномозговой жидкости реактивом Самсона

Реакция Ланди

Степень помутнения обозначить крестами: опалая опалесценция (+), заметная опалесценция – умеренное помутнение – (++++), значительное помутнение – (+++++).  
 Количественное определение общезо белка  
 Расчет провести по калибровочному графику;  
 Реакция Нюне-Апельля  
 Реакцию выразить плюсами (как в реакции Ланди).

**10. Условия хранения и эксплуатации набора**

Набор должен храниться в упаковке предпритяж-жготовителя 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 Ланди 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 сернистого, 14 % можно хранить при комнатной температуре не более 1 года не более 1 года.  
 Насыщенный раствор аммония сернистого можно хранить при комнатной температуре (18-25) °С не более 1 года.

Калибровочный раствор общезо белка после вскрытия флакона можно хранить при температуре (2-8) °С в плотно закрытом флаконе не более 6 месяцев.  
 Для получения надежных результатов необходимо строго 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, ЗАО «ЖКОЛаб»; тел/факс (496-43) 3-30-93, 3-30-85 – отдел сбыта.

Набор разрешен к производству, продаже и применению на территории Российской Федерации. Реактационное удостоверение № ФСР 2009/04659 от 08.04.2009 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 Клинико-диагностических лабораториях.

**2. Характеристики набора**

**2.1. Принцип метода**

**Клеточный состав (цитоз)**

Реактив Самсона превращает цитоглиа клеток в смеси теле 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.

**Качественная реакция Ланди**

Белок с раствором фенола дает помутнение, интенсивность которого зависит от содержания белка. Количественное определение общезо белка в реакции с сульфосалициловой кислотой и натрием сернистым

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

**Глобулины**

Качественная реакция Нюне – Апельля  
 При взаимодействии глобулина с насыщенным раствором сернистого аммония появляется помутнение, интенсивность которого зависит от содержания глобулинов (осаждаются такие белковые фракции, которые остаются не осаждаемыми в реакции Ланди).

**2.2. Состав набора**

Реагент 1 - реакция Самсона (кислота уксусная, 5,3 мол/л, фенол, 0,22 мол/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 – 1л/а пакет (30 г)  
 Реагент 4 - натрий сернистый или натрий сернистый 10-водный – 1/3 пакет (70 г или 160 г)  
 Реагент 5 - калий-сернистый раствор общезо белка 10 г/л – 1 флакон (5,0 мл)  
 Реагент 6 - аммоний сернистый – 1л/а пакет (85 г)

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

Клеточный состав (цитоз)

Повышенный цитоз наблюдается 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 отмечается при нарушении гемодинамики, воспалительных процессах органических поражениях ЦНС и оболочек мозга.

**Глобулины**

Пониженное содержание белка наблюдается при гидроцефалии и гиперсекреции СМЖ.

Минимальная определяемая концентрация глобулинов – 0,05 г/л (0,3 г/л общезо белка).  
 Увеличение глобулиновой фракции наблюдается при кровоизлияниях в мозг, опухолях, менингитах, прогрессирующего паралича, рассеянного склероза. Примесь крови всегда дает положительные глобулиновые реакции.

**Нормальные значения:**

Цитоз - Норма - норма в лейкоцитарном ликворе у взрослых – 2-4х10<sup>6</sup> г/л, у детей до 3 мес – 20-25х10<sup>6</sup> г/л, 3 мес - 1 год – 14-20х10<sup>6</sup> г/л, 1-2 года – 11-14х10<sup>6</sup> г/л, 2-5 лет – 10-12х10<sup>6</sup> г/л, старше 10 лет – 2-6х10<sup>6</sup> г/л.  
 Большая цитерта – 0-1х10<sup>6</sup> г/л, в венгкулярном ликворе – 0-1х10<sup>6</sup> г/л, в субоципитальном – 2-3х10<sup>6</sup> г/л.  
 Концентрация белка: - при помбальной пункции - 0,22-0,33 г/л; при венгкулярной пункции - 0,12-0,20 г/л; при цистеральной 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 на коку и спизостыне, при попадании немедленно промывать пораженное место большим количеством проточной воды. При проглатывании следует выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

1 содержит уксусную кислоту. При работе с ним следует соблюдать осторожность и не допускать попадания на кожу и слизистые. При попадании немедленно промывать 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, противоэпидемиологического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений Министерства здравоохранения СССР" (Москва, 1981 г.)

### 5. Оборудование, материалы и реагенты:

- спектрофотометр или фотоплотрометриметр, длина волны 410 (400-480) нм, кювета с длиной оптического пути 1,0 см;
- термостат, поддерживающий температуру (37 ±1)°С;
- таймер;
- рН-метр;
- смесь для лейкоцитов или часовое стекло;
- камера Фюсса-Розенталя или Горваеа;
- 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. Анализруемые пробы

Спинноомозная жидкость, полученная при лумбальной 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) °С в плотно закрытом флаконе в течение года.

##### 7.1.2. Реактив Панди

К содержимому флакона с реагентом 2 добавлять 25 мл воды дистиллированной, перемешать и поместить в термостат при 37 °С на сутки. В течение этого времени жидкость необходимо несколько раз перемешать. Далее реактив оставить на 1 сутки при комнатной температуре (18-25) °С. 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.

##### 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.

##### 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) °С 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 выдерживать в течение 12 часов при комнатной температуре и отфильтровать. Приготовленный раствор должен иметь рН 7,0-7,1, поэтому при следуют подщелочить раствором аммиака, 10% осторожно добавляя его по каплям (-3 капли). Насыщенный раствор сернокислого аммония можно хранить при комнатной температуре в течение года.

### 7.2. Проведение анализа

#### 7.2.1. Определение цитоза

Спинноомозную жидкость тщательно размешать в течение 2 мин, затем смешать в смесителе для лейкоцитов с реактивом Самсона. До первой метки набрать реактива, до второй метки набрать спинноомозную жидкость. Смесь встряхнуть и оставить на 10-15 мин для прокрашивания клеточных

элементов. Если смесителя нет или жидкости очень мало, допускается смешивание спинноомозной жидкости с реактивом Самсона в соотношении: 10 капель СМЖ и 1 капля реактива. Окрашенную жидкость интенсивно встряхнуть, вылить в смеситель первые 1-2 капли и затем горизонтальном положении на 1 мин для оседания фюсса-Розенталя. Заполненную камеру оставить в

#### 7.2.2. Определение общего белка (реакция Панди)

На предметное стекло налить 2 капли реактива Панди, обочу поместить 1-2 капли спинноомозной жидкости, так чтобы обе жидкости сплились, и через 2 минуты визуально на темном фоне увидеть результаты реакции.

#### 7.2.3. Количественное определение общего белка

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

№ п/п	Калибровочный раствор общего белка, 10 г/л, мл	Раствор натрия хлористого, 9 г/л, мл	Таблица 1	
			4,95	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 анализруемые пробы отмерить в количествах, указанных в таблице 2.

Отмерить, мл	Таблица 2	
	Опытная проба	Контрольная проба
Реагент для определения общего белка	5,0	5,0
Спинноомозная 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 (Е<sub>оп</sub>) 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 пробы тщательно встряхнуть.

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

При концентрации 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 - Альбальта)

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

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

#### 8. Ресурсы литературы

Посчет клеток

Не меняя горизонтального положения, камеру поместить на столик микроскопа.

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

#### Определение общего белка (реакция Панди)

В области соотношения реактива и спинноомозной жидкости возникает помутнение, выраженность которого зависит от содержания белка.