



Інструкція
з використання діагностикумів еритроцитарних для виявлення
популяції Т-лімфоцитів людини
“Анти-СД 3”

IN VITRO

Зберігати при 2-8°C

Тільки для професійного використання.

Набір розрахований на 50 визначень при витраті робочого розчину відповідно цієї методики.

Принцип методу

Принцип методу оснований на визначенні субпопуляції Т- і В-лімфоцитів за допомогою реакції розеткоутворювання з еритроцитами, на яких адсорбовані моноклональні антитіла проти рецепторів CD3 (Т-лімфоцити), CD4 (Т-хелпери), CD8 (Т-супресори та цитотоксичні лімфоцити), CD16 (НК-натуральні кілери), CD22 (В-лімфоцити).

Облік результатів дослідження проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою.

Клінічне значення

Діагностикуми використовують для визначення субпопуляцій лімфоцитів в крові людини з метою оцінки імунного статусу при імунодефіцитах різного генеза, хронічної, аутоімунної патології. А також для імунологічного моніторингу населення, що проживає в екологічно небезпекних регіонах та контролю за імунотерапією у хворих.

Склад набору

1. Діагностикум еритроцитарний, 2.5 ml (мл) (1 фл.)
2. Інструкція з використання.
3. Сертифікат якості.

Матеріал для дослідження

Лімфозавись.

Перелік необхідного устаткування

1. Центрифуга.
2. Пробірки 10 ml (мл).
3. Термостат.
4. Холодильник.
5. Автоматичні дозатори 20 – 200 µl (мкл).
6. Мікроскоп з імерсійною системою.
7. Предметне скло.

Додаткові реагенти

1. Градієнт щільності 1.077.
2. Фізіологічний розчин або фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) pH 7.2-7.4.
3. 0.125% розчин глютарового альдегіду.
4. Фарба Романовського-Гімза.

Підготовка реагентів

Отримання клітин (лімфозависі). Кров з вени 3-5 ml (мл) змішують у пробірці з гепарином, розведеним фізіологічним розчином до 20-25 U/ml (Од/мл), у співвідношенні 1:1.

Гепаринизовану кров розводять в 2 рази фосфатно-сольовим буфером pH 7.2-7.4. У пробірки з 2-3 ml (мл) градієнта щільності 1.077 обережно нашаровують пастерівською піпеткою 4-6 ml (мл) підготовленої крові. Зразки центрифугують 40 min (хв) при 400g.

Для переходу на швидкість обертання слід використовувати формулу: $n = \sqrt{\frac{g}{0.0000112 * r}}$, де

n - швидкість обертання ротору, g - відносне центробіжне прискорення, r - радіус ротору в мм. Обережно піпеткою Пастера видаляють плазму, кільце, в якому містяться лімфоцити з невеликою домішкою моноцитів (до 10 %), відбирають в чисту центрифужну пробірку. Відмивають клітини 2-3 рази фізіологічним розчином або фосфатним буфером pH 7.2-7.4. Бажана концентрація клітин у зависі $2 \times 10^6/\text{ml}$ (мл) (20 клітин у великому квадраті камери Горяєва).

Підготовка діагностикума

Осад еритроцитів ресуспендується погодуванням флакона або стерильним 2 ml (мл) шприцем. Набирають шприцем необхідний для роботи об'єм та переносять у стерильні пробірки¹.

Проведення дослідження

1. У пробірки вносять 50 μl (мкл) CD-діагностикуму та додають 50 μl (мкл) лімфозависі.
2. Інкубуують суміш 40 min (хв) при 37°C.
3. Центрифугують при 1000 g/min (об/хв) протягом 5 min (хв).
4. Інкубуують 60 min (хв) при 4°C².
5. Відбирають надосадову рідину.
6. Додають до осаду 50 μl (мкл) 0.125% розчину глютарового альдегіду, ресуспендується. Витримують 5-7 min (хв), знов ресуспендується.
7. Роблять мазок приблизно на 1 cm^2 (cm^2) площі знежиреного предметного скла.
8. Мазки висушують, фіксують спиртом і забарвлюють за Романовським-Гімзою³.
9. За допомогою світлового мікроскопу з імерсійною системою підраховують відсоток лімфоцитів, що утворили розетки (зв'язали не менш 3-х еритроцитів) із CD-діагностикумами на 200 лімфоцитів.⁴

Примітки

1. Уникати піноутворювання при ресуспендуванні CD-діагностикумів.
2. Можливо залишати в холодильнику до 16 h (год) без попереднього центрифугування.
3. Отримані результати залежать від якості мазків. Мазки рекомендовано робити на добре знежиреному спирт-ефіром склі в вигляді моношара. Запобігати утворення нашарування клітин. Можливо підраховувати розеткоутворюючі лімфоцити в нативному препараті в камері Горяєва. Для полегшення підрахунку в нативний препарат додати 10-20 μl (мкл) фарби для забарвлення ядра лімфоцитів (метиленовий синій, тощо).
4. Не враховувати гранулоцити, агрегати клітин, а також лімфоцити, що потрапили в агрегати.

Оцінка результатів дослідження

В кожній лабораторії необхідно мати свої нормативні значення параметрів, які враховують регіональні, вікові особливості, а також методологічні можливості лабораторії.

1. Відсоток **T-лімфоцитів** дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD3-діагностикумом.

Абсолютна кількість T-лімфоцитів:

$$X = \frac{A \times Y \times C}{10000},$$

де: X – абсолютна кількість у 1 μl (мкл) крові,

A – кількість лейкоцитів у 1 μl (мкл) крові,

Y – відсоток лімфоцитів у формулі крові,

C – відсоток розеткоутворюючих T-лімфоцитів.

2. Відсоток **T-хелперів** (Tx) дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD4-діагностикумом.

3. Відсоток **T-супресорів** (Tc) дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD8-діагностикумом.

IPI: Tx/Tc = 1.4 – 2.0. Де IPI – імунорегуляторний індекс.

4. Відсоток **натуральних кілерів** дорівнює відсотку лімфоцитів, що утворюють розетки із CD16-діагностикумом.

5. Відсоток **В-лімфоцитів** дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD22-діагностикумом. Абсолютну кількість В-лімфоцитів визначають так як і Т-лімфоцитів.

Референтні величини

Відповідно до правил GLP (Гарної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна сама визначити для себе параметри норми, характерні для обстежуваної популяції.

	Норма	Середнє
Т-лімфоцити дорослі, %	50-80	60 ±5
діти, %	47-76	55 ±4.8
Т-хелпери, %	33-46	40 ±3.0
Т-супресори, %	17-30	22 ±1
T _h /T _c	1.4-2.0	
В-лімфоцити, %	17-31	23 ±3.6
Натуральні кілери, %	12-23	16 ± 4.5

Зберігання та стабільність

Усі компоненти набору стабільні до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці, якщо зберігати його щільно закритим при 2-8°C. Під час використання реагентів запобігати забруднення та потрапляння прямих сонячних променів. Не допускається замороження!

Вимоги безпеки та утилізації

1. Уникати потрапляння в рот, очі та на шкіру. В разі потрапляння, промити великою кількістю води та звернутися за консультацією до лікаря.
2. Використовувати засоби індивідуального захисту при роботі з набором.
3. Знезараження та утилізація реагентів, сироваток, тестових слайдів чи скляних пластин проводити згідно з чинним законодавством.

Транспортування

Набори транспортують всіма видами закритого транспорту при температурі до 25°C.

Допускається транспортування при середньодобової температурі 37°C не більше 72 h (год).

Гарантій виробника

1. Виробник гарантує відповідність якості наборів вимогам Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro* № 754 від 02.10.2013 р. при додержанні споживачем умов зберігання.
2. Гарантійний термін зберігання становить 12 mth (міс) з дня виготовлення набору.

Комплектація

	REF 10.001
Вміст	50 визн.
Діагностикум еритроцитарний	1 фл. x 2.5 ml (мл)

 ТОВ «ЛАБОРАТОРІЯ ГРАНУМ», Україна, 61001, м. Харків, вул. Франківська, 14.
Тел./факс: (057) 752-32-31, www.granum.ua

Символи на продукції

	Виробник Виготовлено: Дата виробництва	Придатно до: Термін придатності	Серія: Номер серії
	Виріб медичний для діагностики <i>in vitro</i>		Консультуйтесь з інструкцією із використання
	Берегти від сонячного світла		Знак відповідності Технічним регламентам
обмеження		Засторога. Зверніться до інструкції з використання для отримання інформації щодо застережень, попереджень, запобіжних заходів	