"УТВЕРЖДАЮ"
Генеральный директор
АО "ЭКОлаб"

_____ Т. Ю. Гашенко
"__" _____ 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МОКРОТЫ

(«Клиника – Мокрота»)

1. Назначение

Набор предназначен для проведения бактериоскопического и микроскопического исследования мокроты в клинико-диагностических лабораториях лечебно - профилактических учреждений.

Набор выпускается в трех вариантах комплектации.

Комплект 1 рассчитан на проведение 200 проб при определении кислотоустойчивых микобактерий (КУМ), 100 проб при обнаружении альвеолярных макрофагов с гемосидерином, 300 проб при определении клеток злокачественных новообразований.

Комплект 2 рассчитан на проведение 100 проб при определении кислотоустойчивых микобактерий (КУМ).

Комплект 3 рассчитан на проведение 300 проб при определении клеток злокачественных новообразований.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип метода

Обнаружение кислотоустойчивых микобактерий

Метод окраски кислотоустойчивых микобактерий по Цилю-Нильсену основан на использовании нескольких специальных методических приемов:

- Окраска фуксином (с подогреванием) – при одновременном воздействии нагревания и сильного протравливающего действия фенола (карболовая кислота) повышается способность красителя проникать в микробную клетку и, особенно, в структуры её клеточной стенки, состоящей из липидов, миколовых кислот и восков. Кислотоустойчивые микобактерии окрашиваются фуксином в красный цвет.
- Обесцвечивание. Обработка окрашенных фуксином препаратов 25 % раствором серной кислоты приводит к обесцвечиванию красителя, проникшего в структуры, не обладающие достаточной гидрофобностью и стойкостью к разрушению в кислоте (кислотоустойчивостью). Только кислотоустойчивые микроорганизмы остаются после обесцвечивания окрашенными в малиново-красный цвет. Сапрофитные микроорганизмы, также окрашенные фуксином, обесцвечиваются.
- Контрастирующая окраска – обесцвеченные элементы мазка докрашивают метиленовым синим для придания контрастности препарату при поиске КУМ.

Обнаружения альвеолярных макрофагов с гемосидерином

Аморфные кристаллы гемосидерина (окислы железа жёлтого цвета), расположенные внутриклеточно, при внесении в нативный препарат мокроты раствора калия железистосинеродистого и раствора соляной кислоты вступают в реакцию с образованием берлинской лазури – соединения, окрашенного в голубой или сине – зеленый цвет.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Обнаружение клеток, характерных для воспалительных и злокачественных процессов в лёгких.

Метод основан на воздействии азур – эозиновых красителей типа Май – Грюнвальда и Романовского на клеточные элементы мокроты. Клетки приобретают различную окраску: ядра окрашиваются в тёмно – фиолетовый цвет; ядрышки - в голубой; цитоплазма, в зависимости от её принадлежности к той или другой клетки, принимает соответствующую окраску от розовато – сероватого, бледно – голубого до синего.

2.2. Состав набора

Комплект 1

- Карболовый фуксин по Цилю-Нильсену - 2 флакона (по 100 мл);
- Кислота серная, 25 % объем. - 2 флакона (по 100 мл);
- Метиленовый синий, 1 % - 2 флакона (по 100 мл);
- Калий железистосинеродистый, 5 % - 1 флакон (10 мл);
- Кислота соляная, 5 % - 1 флакон (10 мл);
- Краситель эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду - 1 флакон (100 мл);
- Краситель азур-эозин по Романовскому - 1 флакон (100 мл);
- Фосфатный буфер (сухая смесь) – 1 флакон (2,22 г).
- Бумага фильтровальная размером 4,5×2,5 см - 200 полосок.

Комплект 2

- Карболовый фуксин по Цилю-Нильсену-- 1 флакон (100 мл).
- Кислота серная 25 % объем. – 1 флакон (100 мл)
- Метиленовый синий, 1 % – 1 флакон (100 мл).
- Бумага фильтровальная лабораторная, пластинки размером 4,5х2,5 см - 100 полосок

Комплект 3

- Краситель эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду) – 1 флакон (100 мл).
- Краситель азур-эозин по Романовскому – 1 флакон (100 мл).
- Фосфатный буфер (сухая смесь) - 1 флакон (2,22 г).

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

Кислотоустойчивые микобактерии (КУМ)

Пределы метода световой микроскопии при окраске мазков по Цилю-Нильсену позволяют выявить кислотоустойчивые микроорганизмы при их содержании 5000 – 10000 и более микробных клеток в 1 мл мокроты, что характерно для больных с прогрессирующими формами процесса. Больные с малыми формами заболевания без деструкции лёгочной ткани выделяют значительно меньшее количество КУМ, что может быть ниже предела обнаружения данным методом. Чувствительность метода можно повысить, увеличивая кратность обследования пациента.

Отрицательный результат микроскопического исследования не исключает диагноза туберкулёза.

Гемосидерин – обнаруживают в мокроте при застое в малом круге кровообращения, застойных явлениях в лёгком другой этиологии, инфаркте лёгкого, кровоизлиянии, крупозной пневмонии и др.

Клетки злокачественных новообразований и воспалительных процессов

Величина, цвет и форма ядра и клетки, нарушенное ядерно – цитоплазматическое соотношение, число ядер в клетке, наличие и величина ядрышек, а также другие критерии позволяют обнаружить злокачественные клетки. Злокачественные клетки располагаются на фоне клеточных элементов воспаления, таких как нейтрофилы, альвеолярные макрофаги, моноциты, клетки цилиндрического мерцательного эпителия, а при аллергическом процессе – эозинофилов и неклеточных элементов, таких как спирали Куршмана и кристаллы Шарко – Лейдена.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Меры предосторожности при работе с набором.

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

В состав набора входит фенол, фуксин, метиленовый синий, калий железистосинеродистый, краситель эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду, краситель азур-эозин по Романовскому, кислота серная и кислота соляная. При работе с ними следует соблюдать осторожность и не допускать попадания на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженной 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.), и «Инструкции по унифицированным методам микроскопических исследований для выявления кислотоустойчивых микобактерий в клинико-диагностических лабораториях лечебно - профилактических учреждений» (Приказ МЗ РФ № 109 от21.03.03, Приложение № 10)

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки.

5. Оборудование, материалы, реагенты:

- лотки для сушки и окраски мазков;
- спиртовая или газовая горелка для фиксации препарата и подогревания его при окрашивании карболовым фуксином;
- штатив для просушивания окрашенных стёкол на воздухе в вертикальном или наклонном положении;
- штатив («рельсы») для окраски мазков на предметных стёклах;
- емкости для фиксации и окраски;
- пинцет или щипцы для взятия предметных стёкол с препаратами;
- пипетки глазные, палочки стеклянные;
- стёкла предметные;
- микроскоп;
- таймер;
- чашки Петри;
- бумага фильтровальная;
- вода дистиллированная;
- масло иммерсионное;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. Анализируемые пробы

Мокрота и некоторые другие материалы (экссудат, мазки – отпечатки с биопсийного и операционного материала).

Для окраски по методу Циля – Нильсена срок хранения мокроты в течение 48 – 72 часов при комнатной температуре (18-25) °С.

Для окраски по Романовскому, с целью обнаружения клеток воспаления и/или новообразования, материал должен быть свежесобранным. Срок хранения не более 2 часов.

Препараты, приготовленные из исследуемого материала, могут храниться 3 - 5 дней при комнатной температуре.

7. Проведение анализа

7.1. Приготовление рабочих растворов реагентов

7.1.1. Приготовление фосфатного буферного раствора, pH 6,8-7,2

К содержимому флакона с сухой смесью реактивов для приготовления фосфатного буфера добавить 20 мл дистиллированной воды, растворить при перемешивании.

Добавить полученный концентрат к 2 л дистиллированной воды, перемешать.

Для приготовления небольшого количества буферного раствора смешать полученный концентрат с дистиллированной водой в соотношении 1:100.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Концентрат фосфатного буферного раствора можно хранить при температуре (2-8) °С в течение года.

Фосфатный буферный раствор можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение 3 месяцев, а при комнатной температуре (18-25) °С не более месяца.

7.1.2. Приготовление рабочего раствора красителя азур-эозин по Романовскому

Краситель азур-эозин по Романовскому разбавить фосфатным буферным раствором (см. п.7.1.1) в соотношении 1:10.

Рабочий раствор красителя азур-эозин по Романовскому стабилен при комнатной температуре в течение 8 часов.

7.1.3. Реагенты готовые к применению:

- карболовый фуксин по Цилю-Нильсену;
- кислота серная, 25 % объем.;
- метиленовый синий, 1 %;
- калий железистосинеродистый, 5 %;
- кислота соляная 5 %;
- краситель эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду.

Реагенты можно хранить при комнатной температуре в плотно закрытых флаконах, в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

7.2. Проведение анализа

7.2.1. Обнаружение кислотоустойчивых микобактерий

7.2.1.1. *Приготовление препаратов из нативной мокроты*

Из разных участков образца мокроты выбрать 2-3 гнойных небольших комочка, перенести на новое (не поцарапанное) предметное стекло и с помощью уголка другого предметного стекла равномерно растереть тонким слоем ближе к одному или другому краю предметного стекла на площади размером приблизительно 2×2 или 1,5×2 см в виде круга или овала.

Примечание: При приготовлении препарата для микроскопического исследования необходимо добиться его правильной толщины. Слишком тонкий мазок содержит мало материала, что может привести к ложноотрицательному результату. Слишком толстый мазок трудно хорошо зафиксировать, окрасить. По окончании окраски материал, недостаточно плотно фиксированный на стекле, может быть частично или полностью смыт водой. Толстый препарат плохо просматривается при микроскопическом исследовании.

Не рекомендуется готовить препараты с помощью «растяжки» мокроты между двух предметных стекол или растирания мокроты между двух предметных стекол. Эти способы приготовления препаратов мокроты сопровождается образованием биологически опасного аэрозоля и загрязняют инфицированным материалом края предметных стёкол.

7.2.1.2. *Фиксация мазков*

Приготовленные препараты положить на лотки, выстланные фильтровальной бумагой, и высушить при комнатной температуре в течение 15 – 30 минут.

Высушенный на воздухе препарат зафиксировать над пламенем спиртовой или газовой горелки. Для этого стекло с сухим препаратом трижды медленно провести через верхнюю треть пламени до исчезновения признаков запотевания стекла. Общая продолжительность пребывания препарата в пламени не должна превышать 3 – 5 секунд.

Не допускается фиксация над пламенем горелки сырых препаратов мокроты.

7.2.1.3. *Окраска препаратов*

Предметные стёкла с зафиксированными препаратами поместить на штатив для окраски так, чтобы расстояние между ними составляло примерно 1 см.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

На каждое стекло положить полоску фильтровальной бумаги так, чтобы она полностью закрывала только препарат. Это предотвращает в дальнейшем распределение краски по всему стеклу.

Налить с помощью пипетки на бумагу с избытком раствор карболового фуксина по Цилю-Нильсену.

Внести стекло с препаратом в пламя горелки и дождаться появления пара, что означает закипание на препарате мокроты карболового фуксина по Цилю-Нильсену.

Повторить эту процедуру ещё раз.

Примечание: При подогревании препарата необходимо следить за тем, чтобы фильтровальная бумага, смоченная карболовым фуксином по Цилю-Нильсену, оставалась влажной до конца третьей процедуры. При трёхкратном появлении пара над препаратом мокроты происходит стойкое прокрашивание липоидной оболочки КУМ.

Подогретый мазок оставляют на 3-5 минут, чтобы краситель проник в клеточную систему микобактерий и окрасил её.

Снять с помощью пинцета фильтровальную бумагу.

Остатки краски осторожно смыть с обратной стороны предметного стекла слабой струёй холодной воды, пока не прекратится видимое отхождение фуксина.

Стекло с препаратом вновь положить на «рельсы».

Покрыть полностью всю поверхность препарата 25 % серной кислотой (обесцвечивающим раствором) на 3 минуты, т.е. полного до обесцвечивания.

Тщательно смыть серную кислоту холодной водой с обратной стороны предметного стекла.

Залить препарат 1 % раствором метиленового синего на 1-2 минуты.

Смыть метиленовую синь с препарата холодной водой с обратной стороны предметного стекла.

Высушить окрашенный препарат на воздухе при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.

Препарат не следует промокать фильтровальной бумагой.

Микроскопировать с иммерсионной системой.

7.2.2. Обнаружение альвеолярных макрофагов с гемосидерином

С нативного препарата мокроты, в котором обнаружены альвеолярные макрофаги желтовато-коричневого цвета с единичными крупными и многочисленными мелкими включениями в цитоплазме, подозрительные на содержание в них аморфных кристаллов гемосидерина, осторожно, под контролем малого увеличения микроскопа, снять покровное стекло. На препарат нанести каплю 5% раствора калия железистосинеродистого («жёлтой кровяной соли»), смешать с мокротой уголком покровного стекла, добавить такую же по размеру каплю 5 % соляной кислоты, вновь смешать и накрыть препарат покровным стеклом. Выдержать 10-15 мин и микроскопировать при малом увеличении.

7.2.3. Обнаружение клеточных элементов, характерных для воспалительных и злокачественных новообразований

Нативные препараты мокроты фиксируют фиксатором – красителем эозин-метиленовым синим по Май-Грюнвальду, а затем докрашивают рабочим раствором азур – эозин по Романовскому.

На препарат, высушенный на воздухе, налить краситель эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду так, чтобы он покрыл всё стекло (1-1,5 мл), или опустить в ёмкость с красителем эозин-метиленовым синим по Май-Грюнвальду, выдержать в течение 3-5 мин. После окончания фиксации, краситель смыть слабой струёй воды с обратной стороны предметного стекла с препаратом мокроты.

Стекло с зафиксированным препаратом мокроты вновь положить на «рельсы» налить рабочий раствор красителя азур-эозин по Романовскому (см. п. 7.1.2) 2 – 2,5 мл так, чтобы он покрыл весь мазок, или опустить в ёмкость для окраски препаратов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Время окраски препаратов подобрать предварительно на нескольких фиксированных мазках: экссудат 7 – 10 мин, мокрота 30 – 40 мин.

По окончании окрашивания краску с препарата слить и промыть препарат водопроводной холодной водой, направляя её на обратную сторону предметного стекла. Препарат высушить на воздухе и микроскопировать с иммерсионной системой.

8. Регистрация результатов

Микроскопию нативных препаратов провести при малом (объектив 8×, окуляр 10×) и большом (объектив 40×, окуляр 10×) увеличениях микроскопа.

Микроскопирование окрашенных препаратов провести с иммерсионной системой (объектив 90×, окуляр 10×).

9. Учет результатов реакций

Кислотоустойчивые микобактерии (КУМ)

Оболочка КУМ окрашивается фуксином по Цилю - Нильсену в малиново-красный цвет, а другие микроорганизмы и клеточные элементы обесцвечиваются серной кислотой и окрашиваются метиленовым синим - в голубой.

Градация результатов микроскопического исследования при окраске по методу Циля - Нильсена:

Результат исследования	Число полей зрения (п/з), обязательных для просмотра	Интерпретация результата исследования
КУМ - не обнаружены	300	Отрицательный
КУМ - 1 - 2	300	Результат не оценивается, рекомендуется повторить исследование
КУМ - 1 - 9	100	Положительный, указывают точное число КУМ
КУМ - 10 - 90	100	Положительный - 1+ - единичные КУМ в поле зрения
КУМ - 1 - 10 в 1 п/з	50	Положительный - 2+ - умеренное количество КУМ
Более 10 КУМ в 1 п/з	20	Положительный - 3+ - значительное количество КУМ

Гемосидерин - Альвеолярные макрофаги, содержащие гемосидерин (окислы железа жёлтого цвета), в результате реакции с калием железистосинеродистым в солянокислой среде окрашиваются в синий или сине-зеленый цвет.

Клетки злокачественных новообразований – морфологию этих клеток определить по руководству по цитологии (полиморфизм их размеров, нарушение ядерно - цитоплазматического соотношения в сторону увеличения ядра, изменение формы ядра, наличие в нём множественных ядрышек неправильной формы, митоз клеток).

Клетки воспаления - альвеолярные макрофаги («пылевые клетки»), макрофаги с миелином, гистиоциты, моноциты, эозинофилы, цилиндрический эпителий и др. Морфологию этих клеток и образований определить по руководству по гематологии и цитологии.

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при комнатной температуре (18-25) °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рабочий раствор красителя азур-эозин по Романовскому стабилен при комнатной температуре в течение 8 часов.

Концентрат фосфатного буферного раствора можно хранить при температуре (2-8) °С в течение года.

Фосфатный буферный раствор можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 3-х месяцев, при комнатной температуре (18-25) °С не более месяца в плотно закрытом флаконе.

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

По вопросам, касающимся качества набора «Клиника - Мокрота», 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"

по научной работе С.Г.Марданлы

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru