

«ПОГОДЖЕНО»

Перший заступник голови Державної
служби України з лікарських засобів
13 липня 2012 р. **І.Б. Демченко**

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар клінічної лікарні „Феофанія”
Державного управління справами
І.П. Семенів 22 червня 2011р.

REF HP030.03

ТУ У 24.4-24607793-024:2011

ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ЗАБАРВЛЕННЯ ЗА ЦІЛЕМ-НІЛЬСЕНОМ

IVD

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для диференціального забарвлення мікобактерій туберкульозу (*Mycobacteriaceae tuberculosis* - *M.tuberculosis*) в клініко-діагностичних лабораторіях і науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на проведення **200 аналізів** (при витраті розчинів реагентів 0,5 мл на визначення).

Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 16 °С.

Гарантійний термін придатності набору - 24 місяці від дня виготовлення.

Зберігати в захищеному від світла місці.

Набір призначений для застосування *in vitro* професійно навченим лаборантом.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Принцип методу заснований на різниці в хімічному складі клітинної стінки мікроорганізмів. Кислототривкими називають бактерії, які після фарбування фуксином не знебарвлюються під дією концентрованих мінеральних кислот і спиртів. Особливістю цієї групи бактерій є їх несприйнятність до барвників, тому для їх забарвлення застосовують підігріті концентровані барвники.

Принцип методу забарвлення за Цілем-Нільсенем заснований на здатності різних мікроорганізмів залишатися забарвленими після дії спирто- і кислотовмісними реагентами. Кислотостійкість обумовлена особливостями хімічного складу бактерій.

Найбільш ефективні способи забарвлення за Цілем-Нільсенем для виявлення спирто- і кислототривких бактерій, зокрема сімейства *Mycobacteriaceae* (мікобактерій туберкульозу, лепри та ін.) і деяких простих (кріптоспоридій). Використовувані при цьому основний фуксин і метиленовий синій дозволяють виявити, окрім бактерійної флори, фуксинофільні внутрішньоклітинні включення, характерні для деяких вірусних, особливо респіраторних, інфекцій.

Кислото- та спиртостійки палички (мікобактерії) забарвлюються в червоний колір, всі інші мікроорганізми – в синій на загальному блакитному або синьому фоні.

СКЛАД НАБОРУ

- | | |
|--------------------------------|----------------------------|
| 1. Карболовий розчин фуксину | - 1 флакон з (100 ± 4) мл. |
| 2. Знебарвлюючий розчин 1 | - 1 флакон з (100 ± 4) мл |
| 3. Знебарвлюючий розчин 2 | - 1 флакон з (100 ± 4) мл |
| 4. Розчин метиленового синього | - 1 флакон з (100 ± 4) мл. |

АНАЛІЗУЄМИЙ МАТЕРІАЛ ⁴⁾

Узяття і поводження із зразками необхідно здійснювати згідно лабораторним розпорядженням. Можна використовувати фіксовані нагріванням мазки мокроти, тонкоголкові аспіраційні біоптати, промивні води, відбитки, гній, екsudати, тканинні рідини, рідкі і тверді культури, гістологічні біоптати.

Підготовка придатних високоякісних зразків вимагає особливої уваги.

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

1. **Всі розчини** - готові до використання. Придатні для роботи до закінчення терміну, зазначеного на упаковці, за умови зберігання при температурі від плюс 2 °С до плюс 16 °С.

ОБЛАДНАННЯ

1. Раковина або спеціальний місткий лоток для фарбування;
2. Спеціальний штатив («рейки») для фарбування мазків на предметних стеклах;
3. Пінцет або щипці для узяття предметних стекол;
4. Газовий або спиртовий пальник для підігрівання препарату при фарбуванні карболовим фуксином;

5. Фільтрувальний папір розміром < 4 x 1,5 см для фарбування мазків карболовим фуксином;
6. Дистильована вода для промивання мазків;
7. Штатив для просушування забарвлених стекол на повітрі у вертикальному або похилому положенні.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Предметне скло перед дослідженням знежирюють і роблять на ньому мазок досліджуваних культур. Мазок слід робити тонкими, щоб клітини рівномірно розподілялися на поверхні скла і не утворювали скупчень. Препарат висушують на повітрі, фіксують і виконують наступні дії:

- на кожне скло накладають смужку фільтрувального паперу так, щоб вона повністю закривала мазок. Це роблять для того щоб фарба не розливалася по скла. Одночасно, за рахунок використання фільтрувального паперу, запобігають осадженню на мазок кристалів фарби, які при мікроскопічному дослідженні можуть бути помилково прийняті за кислототривкі мікобактерії;

- наливають на папір **Карболовий розчин фуксину** з лишком і нагрівають препарат над полум'ям пальника до легкої появи пари. При підігріванні препарату стежать за тим, щоб фарба не закипіла, а фільтрувальний папір не висихав. Ні в якому разі не доводьте до повного випарювання рідини. Підігрітий мазок залишають на 5 хвилин, щоб барвник проник в клітинну стінку мікобактерій і зафарбував її;

- пінцетом знімають і видаляють фільтрувальний папір;

- обережно змивають залишки фарби слабким струменем дистильованої води, до тих пір, поки не припиниться видиме відходження фарби. При промиванні мазків використовують холодну дистильовану воду або воду кімнатної температури.

- перед тим, як нанести на скло наступний розчин, щипцями або пінцетом беруть кожне скло і нахилиють, щоб з нього стекла вода; це запобігає розбавленню наступного реактиву;

- мазок знебарвлюють 3 хвилини із **Знебарвлюючим розчином 1**, повністю покриваючи всю поверхню мазка (**див.прим**);

- мазок ретельно промивають дистильованою водою;

- на мазок наносять **Знебарвлюючий розчин 2**, повністю покриваючи всю поверхню мазка (**див.прим**), до повного візуального знебарвлення (1-3 хв);

- мазок ретельно промивають дистильованою водою, дофарбовують протягом 1 хвилини, не перевищуючи експозицію, **Розчином метиленового синього (див.прим)**;

- знову акуратно промивають проточною водою, нахилиючи кожне скло, щоб стікала вода;

- висушують на відкритому повітрі при кімнатній температурі у вертикальному або похилому положенні. Не слід промокати препарат.

- препарат досліджують з імерсійною системою в світловому мікроскопі. На дослідження препарату звичайно потрібно біля 15 хвилин. Цього часу достатньо, щоб виявити поодинокі мікобактерії в препараті. В цьому випадку необхідно переглянути не менш 300 полів зору⁴⁾.

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ⁴⁾

В результаті, при правильному фарбуванні, мікобактерії туберкульозу забарвлюються в малиново-червоний колір, а інші мікроорганізми і клітинні елементи - у блакитний.

В останній час при мікроскопії можна спостерігати морфологічні і тінкторіальні зміни *M.tuberculosis* під впливом антимікобактеріальних препаратів, що приводить до ускладнення диференціації їх від атипових і сапрофітних мікобактерій. Відомо, що *M.tuberculosis* можуть частково змінювати кислотостійкість, набувати кокоподібної, сегментоподібної форми, а також подвійних коків, розташованих бобоподібно, як всередині лейкоцитів, так і самостійно. Це ускладнює їх диференціацію.

Кількість мікобактерій в мазку в процесі антимікобактеріальної терапії є орієнтовним показником її ефективності або непрямим свідченням розвитку стійкості мікобактерій до антимікобактеріальних препаратів.

Дуже важливо визначити живі чи неживі мікобактерії, оскільки вирішити це питання неможливо шляхом фарбування мазка за Цілем-Нільсеном. З цією метою приготований мазок фіксують над полум'ям, фарбують 1,0 % розчином малахітового зеленого протягом 5 - 10 хвилин, підігрівачи мазок до появи парів. Після цього фарбу зливають, мазок промивають водою і забарвлюють карболовим фуксином (в розведенні 1:5) протягом 5 хвилин. При цьому живі мікобактерії фарбуються в зелений колір, а нежиттєздатні - в червоний. Цитохімічний метод

визначення життєздатності мікобактерій застосовують для проб з великою кількістю мікобактерій.

ДЖЕРЕЛА ПОМИЛОК

1. Забруднення проби нормальною мікробною флорою, кров'ю або фарбувальними речовинами можуть порушити фарбування.
2. При використанні **Розчину метиленового синього** для забарвлення фону препарату (контрастуюче забарвлення) треба мати на увазі, що при товстому мазку або перевищенні часу забарвлення цей барвник може як би «приховати» кислототривкі мікобактерії.
3. Для запобігання отримання хибнопозитивних результатів (оцінка результатів світлової мікроскопії) при проведенні бактеріоскопії необхідно:
 - імерсійне масло наносити на скельце піпеткою, не торкаючись поверхні мазка;
 - об'єктив не повинен торкатися поверхні мазка, а легко стикатися з верхнім меніском імерсійного масла.⁴⁾
4. Предметні стекла використовуються лише нові. Мазки з позитивними результатами знищують в установленому порядку, так як на стеклах можуть зберігатися мікобактерії попередніх аналізів.⁴⁾

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ⁴⁾

Бактеріоскопічний метод дослідження залишається одним з основних. Перевага цього методу - в його швидкості. Але можливості його обмежені: при прямій бактеріоскопії мазка, забарвленого за Цілем-Нільсенем, мікобактерії туберкульозу можуть бути виявлені тільки при дуже великій їх кількості – **5 000 – 10 000** бактеріальних клітин і більше в **1,0 мл** патологічного матеріалу. Хворі, особливо в процесі антибактеріальної терапії, часто виділяють мікобактерії в значно меншій кількості, тоді цей метод може виявитися недостатньо чутливим для їхнього виявлення. У таких випадках застосовують методи "збагачення" патологічного матеріалу.

M.tuberculosis - тонкі, прямі чи злегка вигнуті палички розмірами (1,0 - 10,0) x (0,2-0,6) мкм, зі злегка закругленими кінцями, у цитоплазмі містять зернисті утворення. Морфологія істотно варіює в залежності від віку культури й умов культивування - в молодих культурах палички довші, а в старих схильні до простого розгалуження. Іноді утворюють коковидні структури і L-форми, що зберігають патогенність, а також фільтрівні форми, патогенна роль яких залишається недостатньо вивченою.

Нерухомі, спор не утворюють, позбавлені капсул, але мають мікрокапсулу, яка відокремлена від клітинної стінки осмієфобною зоною.

Кислотостійкі, що обумовлено високим вмістом ліпідів і міколової кислоти в клітинній стінці, а також утворюють кислотолабільні гранули, які переважно складаються з метафосфату (зерна Муха), розташовуються вільно або в цитоплазмі паличок.

Аероби, але здатні рости у факультативно анаеробних умовах; 5,0 - 10,0 % вмісту CO₂ сприяє більш швидкому росту. Розмножуються повільно, в середньому 14-18 годин. Температурний оптимум 37 – 38 °С; потреба в рН 7,0-7,2 (але можуть рости в межах 4,5-8,0). Для росту мають потребу в присутності білкового субстрату і гліцерину, а також вуглецю, хлору, сірки, фосфору, азоту, факторів росту (біотину, нікотинової кислоти, рибофлавіну й ін.), іонів (Mg⁺⁺, K⁺, Na⁺, Fe⁺⁺). Для вирощування найчастіше використовують щільні яєчні середовища (Льовенштайна-Єнсена, Фінна-2 й ін.).

Клінічний діагноз повинен встановлюватися на основі інтеграції клінічних і лабораторних даних.

ПРИМІТКА⁴⁾

Для запобігання отримання хибнопозитивних результатів бактеріоскопії рекомендується знебарвлюючі та дофарбовуючі розчини наносити безпосередньо на мазок. Слід відмовитися від занурення скелець з мазками в посуд із знебарвлюючими та дофарбовуючим розчинами.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Необхідне застосування спеціального захисного одягу і рукавичок. Треба уникати попадання мікроорганізмів в оточуюче середовище. Необхідно ретельно дотримуватися спеціальних інструкцій та техніки безпеки.

УТИЛІЗУВАННЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і спільно з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

Паперову упаковку здайте в макулатуру, виполоскану тару - в сортоване сміття.

ЛІТЕРАТУРА

1. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования/под ред. М.О. Биргера/. М.:Медицина, 1982, с.24.
2. Balows, A. et al., Manual of Clinical Microbiology, ed. 5th. 1991.
3. Katila M-L., Mykobakteerivärjäykset, Moodi, 4-5/2000.
4. Наказ МОЗ України від 06.02.2002, № 45.



CP	10618/2011
	13.07.2012

Набір виробляє ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика»,
Україна, 49051 Дніпропетровськ, вул. Каштанова, 32
Тел./факс: (056) 747-47-76, 747-45-34
Тел.: (093) 573-75-35, (067) 535-15-73, (095) 168-36-54
E-mail: felicit_d@ua.fm <http://www.felicit.com.ua>

Предлагаем Вашему вниманию ассортимент выпускаемой нами продукции

- для выполнения скрининга и количественного определения аналитов на латексных системах:
Для качественного и полуколичественного определения анти-стрептолизин О (АСЛ-О), ревматоидного фактора (РФ), С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови человека («Филисит-АСЛ-О- латекс», «Филисит- РФ - латекс», «Филисит- СРБ – латекс»).

- контрольные материалы для оценки выполнения исследований обмена веществ:
«Филисит-СКВ», «ФилоНорм», «ФилоПат», «Калибратор альбумина 1000 мг/л», «Калибраторы белка», «Фило-БФК», «Калибраторы креатинина», «Калибраторы гемихрома», «МультиКалибратор», «Филисит-КГБС», «Калибраторы глюкозы», «Билирубин-калибратор», «Калибраторы гемоглобина», «Калибраторы цианметгемоглобина», «Креатинин-калибратор»

- наборы реактивов для клинической биохимии для анализаторов открытого типа различных изготовителей:

КИНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ: «Креатинин-КИН», «ЛДГ», «ЛДГ1», «АЛТ-КИН», «АсАТ-КИН», «Щелочная фосфатаза ДЕА», «Щелочная фосфатаза АМР», « α -Амилаза КИН», «ГГТ-КИН», «Холинестераза- КИН» и

(МОНОРЕАГЕНТНЫЕ МЕТОДИКИ) (подходят как для ручных методик, так и для анализаторов открытого типа различных изготовителей): «Триглицериды - Ф», «Кальций ARS», «Фосфор-UV», «Альбумин», «Общий белок», «Холестерин Ф», «Холестерин-HDL», «Глюкоза Ф», «Общий белок-УЛ», «Калий», «Кальций», «Магний», «Хлориды-Ф», «Гемоглобин», «Гемоглобин-ГХ», «Мочевая кислота Ф», «Глюкоза МОНО».

- наборы реактивов для клинической биохимии для ручных методик:
«Железо (ЖСС)», «Серогликоиды», «Холестерин», «Триглицериды», «Общие липиды», «Фруктоза», «Билирубин», «Фосфор», «Хлориды-Т», «Натрий», «Креатинин», «Мочевая кислота», «Мочевина-Д», «Мочевина-У», «Мочевина-ОФА», «Тимоловая проба», «АЛТ», «АсАТ», «ГГТ», «Щелочная фосфатаза», « α -Амилаза», «Щелочная фосфатаза НФФ», «Холинестераза-АХХ», «Холестерин-HDL Ф», «Холестерин-LDL Ф».

- наборы реактивов для микробиологических исследований: «Набор для окраски по Граму» (три модификации : с Карболовым фуксином по Цилю, с нейтральным красным и с Сафранином), «Карболовый фуксин (1% раствор)», «Набор для окраски по Цилю-Нильсену», «ЛейкоФарб» (набор для дифференциальной окраски лейкоцитов), «РетикулоФарб» (набор для дифференциальной окраски ретикулоцитов и эритроцитов).

А так же в ассортименте выпускаемой нами продукции:

- реактив Эрлиха.