

Набор реагентов для клинического анализа мокроты

Product Categories: [Наборы реагентов](#)

Product Page:

<http://ivdvlmedia.ru/shop/obshheklinicheskie-issledovaniya/mikroskopiya-obshheklinicheskie-issledovaniya/issledovanie-mokroty/nabory-reagentov-issledovanie-mokroty/nabor-reagentov-dlya-klinicheskogo-analiza-mokroty/>

Product Summary

Кат.№HMVL Набор реагентов для клинического анализа мокроты

Набор реагентов для клинического анализа мокроты предназначен для проведения микроскопического и бактериологического исследования мокроты в клиничко-диагностических лабораториях.

Набор рассчитан на 100 определений при обнаружении альвеолярных макрофагов с гемосидерином, 200 определений при выявлении кислотоустойчивых микобактерий, 300 определений при выявлении клеток злокачественных новообразований.

Product Description

Набор реагентов для клинического анализа мокроты

Набор реагентов для клинического анализа мокроты предназначен для проведения микроскопического и бактериологического исследования мокроты в клиничко-диагностических лабораториях.

Принцип реакции:

Исследование мокроты, смывов и материала, добытого при бронхоскопии, производят с целью диагностики туберкулеза, новообразований, актиномикоза и других патологических процессов.

Определение альвеолярных макрофагов, содержащих гемосидерин. Альвеолярные макрофаги, содержащие гемосидерин – сидерофаги, имеют в цитоплазме золотисто-желтые включения. С достоверностью их определяют реакцией на берлинскую лазурь, при этом гемосидерин, лежащий всегда внутриклеточно, окрашивается в голубой или сине-зеленый цвет. Эти клетки обнаруживают в мокроте при застойных явлениях в легком, инфарктах легкого, кровоизлияниях.

Обнаружение кислотоустойчивых микобактерий. Кислотоустойчивыми называют бактерии, которые после окрашивания фуксином не обесцвечиваются под действием концентрированных минеральных кислот и спиртов. Особенностью этой группы бактерий является их невосприимчивость к красителям, поэтому для их окрашивания применяют подогретые концентрированные красители.

Принцип метода окраски по Циль-Нильсену основан на способности различных микроорганизмов оставаться окрашенным после воздействия спирто- и кислотосодержащими реагентами. Кислотоустойчивость обусловлена особенностями химического состава бактерий.

Наиболее эффективны способы окраски по Циль-Нильсену для выявления спирто- и кислотоустойчивых бактерий, в частности семейства *Mycobacteriaceae* (микобактерий туберкулеза, лепры и др.) и некоторых простейших (криптоспоридий). Используемые при этом основной фуксин и метиленовый синий позволяют выявить, помимо бактериальной флоры, фуксинофильные внутриклеточные включения, характерные для некоторых вирусных, особенно респираторных, инфекций.

Обнаружение клеток, характерных для воспалительных и злокачественных процессов в легких. Метод основан на воздействии азур-эозиновых красителей на клеточные элементы мокроты. Ядра окрашиваются в фиолетовый или темно-фиолетовый цвет, ядрышки – голубой, цитоплазма, в зависимости от ее принадлежности с той или другой клетке, принимает соответствующую окраску от розового, розового-серого до бледно-голубого, синего.

Реагенты:

Карболовый фуксин Циля – 1 флакон (200 мл)

Солянокислый спирт (концентрат) – 1 флакон (20 мл)

Метиленовый синий (1%) – 1 флакон (200 мл)

Калий железистосинеродистый, 5% - 1 флакон (10 мл)

Кислота соляная (5%) – 1 фл (10 мл)

Эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду – 1 флакон (100 мл)

Азур-эозин по Романовскому - 1 флакон (100 мл)

Фосфатный буфер – 1 флакон.

Оборудование. -фарфоровые ступки; -стеклянные палочки;

-чашки Петри; -воронки;

-предметные стекла; -покровные стекла;

-пробирки; -штативы;

-горелка; -весы;

-микроскоп; -бумага фильтровальная;

-инструменты для отбора мокроты; -рельсы для окраски мазков;

-перчатки резиновые; -емкости для фиксации и окраски.

Микроскопическое исследование состоит из изучения нативных и окрашенных препаратов

Приготовление нативных препаратов.

Материал выбирают из различных составных частей (слизи, гноя, кровянистых участков

Необходимо также брать для исследования все частицы, выделяющиеся формой, окраской, плотностью.

Отбирают непрозрачные комочки сероватого или желтоватого оттенка, переносят требуемое количество материала на предметное стекло, используя деревянную палочку или бактериологическую петлю, равномерно распределяют материал по предметному стеклу на площади 2 на 1 см, высушить. Препарат просматривают сначала с малым увеличением (объектив 8х, окуляр 10х), затем с большим (объектив 40х, окуляр 10х). Просмотр с малым увеличением дает ориентировочное представление о качестве выбранного материала, о количестве тех или иных клеток и других образований, позволяет быстрее обнаружить элементы, встречающиеся в мокроте в небольшом количестве (эластические волокна, спирали Куршмана, клетки опухоли и т.д.) просмотр с большим увеличением необходим для детального исследования препаратов.

Проведение определения:

1.Обнаружение альвеолярных макрофагов

С нативного препарата, 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, смешать с мокротой уголком покровного стекла или стеклянной палочкой, 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.

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

2.Обнаружение кислотоустойчивых микобактерий

Предметное стекло перед исследованием должно быть тщательно вымыто и обезжирено смесью для обезжиривания предметных стекол. Выбрать в мокроте непрозрачные комочки сероватого или желтоватого оттенка, перенести требуемое количество материала на предметное стекло, используя деревянную палочку или бактериологическую петлю, равномерно распределить материал по предметному стеклу на площади 2 на 1 см, высушить. Высушенные стекла с мокротой три раза проводят через среднюю часть пламени горелки до исчезновения признаков запотевания стекла. Общая продолжительность пребывания мазка в пламени не должна превышать 3-5 секунд. Для приготовления рабочего (3%) раствора солянокислого спирта, необходимо во флакон емкостью 200 мл внести концентрат солянокислого спирта (20 мл) и добавить 180 мл этилового спирта (96%), либо приготовить рабочий раствор солянокислого спирта в необходимом количестве из расчета 1:9 (концентрат-спирт). Раствор тщательно перемешать, хранить в закрытом состоянии

Поместить на мазок полоску фильтровальной бумаги и нанести на бумагу несколько капель (3-4 капли) карболового фуксина Циля и нагреть мазок над пламенем горелки до появления паров. Оставить мазок для остывания и окраски.

5 минут

Слить краску, удалить фильтровальную бумагу и сполоснуть в проточной воде

30 секунд

Поместить мазок в солянокислый спирт до полного визуального обесцвечивания
3 минуты

Смыть проточной водой
10 секунд

Поместить мазок в метиленовый синий
1-2 минуты

Промыть стекла в проточной воде
1 минута

Высушить.

Микроскопировать в световом микроскопе с масляной иммерсией (окулярх10, увеличенийх100)

Кислотоустойчивые микроорганизмы окрашиваются в красный цвет, кислотонеустойчивые - в синий. Кислотоустойчивые микобактерии туберкулеза имеют в длину примерно 1 - 10 мкм, в ширину - 0,2 - 0,6 мкм. Обычно они видны в виде тонких изящных палочек, но иногда можно обнаружить изогнутые или извитые варианты. При окраске карболовым фуксином микобактерии туберкулеза выявляются в виде тонких, слегка изогнутых палочек малиново-красного цвета, содержащих различное количество гранул. Микроорганизмы, располагающиеся по одиночке, парами или в виде групп, хорошо выделяются на голубом фоне других компонентов препарата. Нередко бактериальные клетки могут располагаться в виде римской цифры "V". Внутри отдельных микробных клеток могут обнаруживаться участки более интенсивного окрашивания, в результате чего они похожи на "бусы", а более слабо окрашенные участки могут быть видны в виде "полос".

3. Исследование на клетки злокачественных опухолей

Исследуют нативные и окрашенные препараты. Препараты мокроты, предназначенные для цитологического исследования, делают тонкими, для чего материал осторожно растягивают на стекле препаровальными иглами. Признаки злокачественности клеток: 1) полиморфизм величины, а часто формы клеток; отдельные клетки могут быть гигантских размеров; 2) нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения в сторону увеличения ядра, иногда до гигантских размеров; 3) неправильная, часто уродливая форма ядра; 4) наличие в ядрах нуклеол, больших, множественных, неправильной формы; 5) часто встречающиеся клеточные митозы; 6) способность клеток к фагоцитозу; 7) химическая анаплазия, гиперхромия ядра и резкая базофилия цитоплазмы отдельных клеток.

Небольшое количество одиночно расположенных клеток перечисленными признаками не является достоверным. Для подтверждения диагноза необходимо искать групповое их расположение в виде комплексов. Для распознавания клеток с признаками злокачественности требуется просмотр большого количества препаратов.

Для приготовления буферного раствора с рН 6,8 – 7,2 рекомендуется буферную смесь развести в 3 л дистиллированной воды. Полученный раствор использовать для разведения красителя и промывки стекол.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КРАСИТЕЛЯ АЗУР-ЭОЗИНА ПО РОМАНОВСКОМУ

Смешать краситель «Диахим-Гемистейн-Р» с буферным раствором в соотношении 1:10 – 1:12. На нефиксированные мазки крови налить неразбавленный раствор фиксатора-красителя «Диахим-Гемистейн-М-Г» так, чтобы он покрывал весь мазок. Через 2 минуты краситель слить. Далее красить рабочим раствором красителя азур-эозина по Романовскому («Диахим-Гемистейн-Р») в течение 10-40 минут (режим окраски подбирается опытным путем). По истечению этого времени препараты промыть буферным раствором, высушить на воздухе и микроскопировать. Окраска форменных элементов быть следующей: ядра лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов - фиолетовые; цитоплазма

лимфоцитов - голубая, серо-голубая или сине-голубая; цитоплазма моноцитов - серо-голубая; цитоплазма нейтрофилов - бледно-розовая или розово-серая; зернистость нейтрофилов - фиолетовая или красно-фиолетовая; зернистость эозинофилов - оранжево-красная, розово-красная или розово-фиолетовая; зернистость базофилов - фиолетовая.

Микроскопию окрашенных препаратов провести с иммерсионной системой (объектив 90x, окуляр 10x).