

Лабораторна діагностика туберкульозної інфекції: навчальний посібник

У навчальному виданні представлені сучасні уявлення про лабораторну діагностику туберкульозу з урахуванням досягнень провідних міжнародних експертів. Наводяться матеріали щодо організації роботи лабораторії, підготовки персоналу, вимоги до приміщення лабораторії, оснащення, забезпечення належного рівня біологічної безпеки та безпеки праці, контролю якості роботи лабораторії. Розглядаються культуральні методи дослідження на щільних та рідких живильних середовищах, процедури приймання, реєстрації та оброблення діагностичного матеріалу, мікроскопія зразків матеріалу, техніка посіву, інкубація, облік результатів, диференціація та ідентифікація мікобактерій. Наводяться методи визначення чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів та контроль якості цих досліджень. Книга містить додатки, а також кольорову вклейку, що ілюструє текстовий матеріал.

Для організаторів і фахівців бактеріологічних лабораторій закладів протитуберкульозної служби України, студентів медичних закладів вищої освіти, лікарів-фтизіатрів, наукових і педагогічних працівників, які займаються проблемами діагностики і лікування хворих на туберкульоз.

Ю.І. ФЕЩЕНКО
О.А. ЖУРИЛО
А.І. БАРБОВА

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

РЕКОМЕНДОВАНО
проблемною комісією
«Ппульмонологія і фтизіатрія»
МОЗ та НАМН України
як навчальний посібник

Київ
ВСВ «Медицина»
2019

УДК 616-002.5;616-092.4
ББК 55.4;в6Л.Р.я73
ФЗ1

*Рекомендовано проблемною комісією «Ппульмонологія і фтизіатрія»
МОЗ та НАМН України як навчальний посібник
(протокол № 3 від 20.03.2019)*

Розробники:

Лабораторія мікробіології і біохімії туберкульозу ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України», м. Київ;

Центральна референс-лабораторія з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ України, м. Київ

Автори:

Ю.І. Феценко — д-р мед. наук, професор, академік НАМН України, директор ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України»;

О.А. Журило — д-р мед. наук, керівник лабораторії мікробіології і біохімії туберкульозу ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України»;

А.І. Барбова — канд. мед. наук, керівник Центральної референс-лабораторії з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ України, старший науковий співробітник лабораторії мікробіології і біохімії туберкульозу ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України»

У навчальному виданні представлені сучасні уявлення про лабораторну діагностику туберкульозу з урахуванням досягнень провідних міжнародних експертів. Наводяться матеріали щодо організації роботи лабораторії, підготовки персоналу, вимоги до приміщення лабораторії, оснащення, забезпечення належного рівня біологічної безпеки та безпеки праці, контролю якості роботи лабораторії. Розглядаються культуральні методи дослідження на щільних та рідких живильних середовищах, процедури приймання, реєстрації та оброблення діагностичного матеріалу, мікроскопія зразків матеріалу, техніка посіву, інкубація, облік результатів, диференціація та ідентифікація мікобактерій. Наводяться методи визначення чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів та контроль якості цих досліджень. Книга містить додатки, а також кольорову вклейку, що ілюструє текстовий матеріал.

Для організаторів і фахівців бактеріологічних лабораторій закладів протитуберкульозної служби України, студентів медичних закладів вищої освіти, лікарів-фтизіатрів, наукових і педагогічних працівників, які займаються проблемами діагностики і лікування хворих на туберкульоз.

Рецензенти:

В.М. Мельник — д-р мед. наук, професор, заступник директора з наукової та науково-організаційної роботи ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України»;

В.П. Мельник — д-р мед. наук, професор, завідувач кафедри інфекційних захворювань, фтизіатрії і пульмонології ПВНЗ «Київський медичний університет УАНМ»

ISBN 978-617-505-761-2

© Ю.І. Феценко, О.А. Журило, А.І. Барбова, 2019
© ВСВ «Медицина», оформлення, 2019

ЗМІСТ

Скорочення та умовні позначення.....	9
Передмова	11
Розділ 1. ВИМОГИ ДО ВЛАШТУВАННЯ БАКТЕРІОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ З ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ	12
1.1. Вимоги до приміщення бактеріологічної лабораторії.....	12
1.2. Розміщення приладів та обладнання в лабораторії	20
1.3. Основне обладнання та прилади	28
Розділ 2. ВИМОГИ ДО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ ТА БЕЗПЕКИ ПРАЦІ В БАКТЕРІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНОЇ СЛУЖБИ	51
2.1. Шляхи поширення туберкульозної інфекції	52
2.2. Класифікація лабораторій, у яких проводять діагностику туберкульозу	55
2.3. Заходи щодо запобігання ризику внутрішньолабораторного зараження.....	59
2.4. Методи знезараження об'єктів	65
2.5. Робота з відходами у лабораторіях, у яких працюють зі збудником туберкульозу.....	71
2.6. Обладнання, спецодяг, засоби індивідуального захисту для забезпечення безпеки.....	73
2.7. Заходи у разі надзвичайної ситуації в лабораторії	76
Розділ 3. ДЕЯКІ БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>Mycobacterium</i>	80
Розділ 4. ДІАГНОСТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ.....	83
4.1. Організація збирання діагностичного матеріалу	83
4.2. Контейнери для збирання діагностичного матеріалу	85

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

4.3. Види діагностичного матеріалу.....	85
4.4. Зберігання і транспортування матеріалу	88
4.5. Прийом та реєстрація матеріалу.....	90
4.6. Оцінювання об'єму та якості матеріалу, що надійшов	91
Розділ 5. МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ КИСЛОТОСТІЙКИХ БАКТЕРІЙ	92
5.1. Приготування мазків.....	92
5.2. Забарвлення мазків за методом Ціля—Нільсена	95
5.3. Налаштування мікроскопа і методика дослідження препаратів	97
5.4. Облік та інтерпретація результатів мікроскопії за методом Ціля—Нільсена	100
5.5. Реєстрація результатів дослідження.....	100
5.6. Забарвлення мазків флуорохромними барвниками	101
5.7. Облік результатів при забарвленні флуорохромними барвниками	104
5.8. Внутрішній контроль якості мікроскопічного дослідження на кислотостійкі бактерії.....	105
Розділ 6. ОБРОБЛЕННЯ ДІАГНОСТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ, ДЕКОНТАМІНАЦІЯ ТА КОНЦЕНТРАЦІЯ ЗРАЗКІВ.....	109
6.1. Стандартні методи розрідження та деконтамінації	110
6.1.1. Оброблення мокротиння	111
6.1.2. Оброблення інших видів діагностичного матеріалу	116
6.2. Внутрішньолабораторний контроль якості деконтамінації	118
Розділ 7. ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА, ПОСІВИ І КУЛЬТИВУВАННЯ.....	124
7.1. Характеристика живильних середовищ.....	124
7.2. Приготування щільних живильних середовищ для культивування мікобактерій	125
7.3. Внутрішньолабораторний контроль якості щільних живильних середовищ.....	129
7.4. Техніка посіву та інкубації на щільному середовищі.....	131

7.5. Оцінювання та облік результатів посівів діагностичного матеріалу на щільному середовищі.....	133
7.6. Дослідження з використанням рідких живильних середовищ.....	137
7.6.1. Автоматичні та напівавтоматичні аналізатори.....	137
7.6.2. Основні принципи культивування мікобактерій на рідких живильних середовищах.....	139
7.6.3. Автоматизована система VASTEC MGIT 960	140
Розділ 8. ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗНОГО КОМПЛЕКСУ, ВИДОВА ІДЕНТИФІКАЦІЯ МІКОБАКТЕРІЙ	149
8.1. Попередня (родова) ідентифікація комплексу <i>M. tuberculosis</i>	149
8.2. Диференціація <i>M. tuberculosis complex</i> від нетуберкульозних мікобактерій.....	152
8.3. Видова ідентифікація мікобактерій туберкульозного комплексу.....	156
8.4. Ключові тести і схеми ідентифікації мікобактерій.....	166
8.5. Внутрішньолaborаторний контроль якості попередньої ідентифікації та визначення виду мікобактерій.....	171
8.6. Імунохроматографічна ідентифікація комплексу <i>M. tuberculosis</i>	171
8.7. Молекулярно-генетична ідентифікація мікобактерій.....	173
8.8. Збереження виділених штамів мікобактерій.....	173
Розділ 9. ДОСЛІДЖЕННЯ З ВИЗНАЧЕННЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ ЧУТЛИВОСТІ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ	175
9.1. Основні поняття.....	175
9.2. Механізми розвитку стійкості мікобактерій до медикаментозних препаратів.....	177
9.3. Організація досліджень визначення медикаментозної чутливості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів.....	178
9.4. Методи визначення медикаментозної чутливості мікобактерій.....	180

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

9.4.1. Метод пропорцій на щільному середовищі Левенштейна—Єнсена (модифікований метод Канетті)...	182
9.4.2. Непрямий метод абсолютних концентрацій на щільному середовищі Левенштейна—Єнсена	191
9.4.3. Дослідження медикаментозної чутливості <i>M. tuberculosis</i> у системі ВАСТЕС MGIT 960	195
9.4.4. Альтернативні методи	210
9.4.5. Контроль якості досліджень з визначення медикаментозної чутливості <i>M. tuberculosis</i>	212
9.4.6. Реєстрація бактеріологічних досліджень та їх результатів.....	213

Розділ 10. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ

ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

10.1. Загальні положення.....	219
10.2. Молекулярно-генетичні методи визначення медикаментозної чутливості <i>M. tuberculosis</i>	221
10.3. Порядок застосування молекулярно-генетичних методів у лабораторіях з діагностики туберкульозу.....	225
10.3.1. Організація та здійснення комплексного дослідження матеріалу із застосуванням системи GeneXpert MTB/RIF (GeneXpert MTB/RIF ULTRA)	226
10.3.2. Організація та здійснення комплексного дослідження матеріалу з використанням ПЛР з детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами ..	228
10.3.3. Формулювання відповіді про результат дослідження при використанні молекулярно-генетичних систем.....	231
10.3.4. Аналіз дискордантних результатів	232
10.3.5. Заходи безпеки	233

Розділ 11. ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ ДОСЛІДЖЕНЬ

У БАКТЕРІОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ ПТС

11.1. Основні вимоги до організації внутрішнього контролю якості досліджень у бактеріологічних лабораторіях ПТС України	234
11.2. Контроль якості на долабораторному етапі	243

ЗМІСТ

11.3. Внутрішній контроль якості бактеріоскопічних досліджень	245
11.4. Внутрішній контроль якості бактеріологічних досліджень	248
11.5. Внутрішній контроль якості попередньої ідентифікації та визначення виду мікобактерій.....	251
11.6. Контроль якості реагентів для первинного посіву в системі VASTEC MGIT	251
11.7. Контроль якості лабораторних процедур при дослідженні в системі VASTEC MGIT 960	254
11.8. Внутрішній контроль якості передпосівного оброблення біологічного матеріалу	255
11.9. Внутрішній контроль якості ідентифікації виділених культур імунохроматографічними смужками.....	258
11.10. Внутрішній контроль якості визначення медикаментозної чутливості <i>M. tuberculosis</i>	259
11.11. Облік та видача результатів бактеріологічного дослідження	259
11.12. Аналіз результатів бактеріологічного дослідження	261
11.13. Внутрішній контроль якості молекулярно-генетичних досліджень на туберкульоз.....	262
11.14. Внутрішній контроль якості досліджень при використанні картриджів Xpert MTB/RIF	263
11.15. Контроль якості досліджень при використанні ПЛР із детекцією методом гібридизації з типоспецифічними зондами (лінійний зонд-аналіз)	264
Розділ 12. ЗОВНІШНЄ ОЦІНЮВАННЯ ЯКОСТІ ДОСЛІДЖЕНЬ	265
12.1. Зовнішнє оцінювання якості бактеріоскопічних досліджень	265
12.2. Зовнішнє оцінювання якості бактеріологічних досліджень	277
12.3. Зовнішній контроль якості молекулярно-генетичних досліджень	280
Розділ 13. УДОСКОНАЛЕННЯ ЯКОСТІ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ.....	281

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

ДОДАТКИ.....	283
<i>Додаток 1.</i> Бактеріологічна ідентифікація нетуберкульозних мікобактерій	283
<i>Додаток 2.</i> Видова ідентифікація нетуберкульозних мікобактерій за допомогою молекулярно-генетичного методу.....	290
<i>Додаток 3.</i> Рекомендації до структури Настанови з якості.....	295
<i>Додаток 4.</i> Вимоги щодо обслуговування обладнання лабораторії	296
<i>Додаток 5.</i> Мінімальний набір тест-штамів для контролю якості живильних середовищ і лабораторних процедур (залежно від видів досліджень, на які атестована лабораторія).....	300
Рекомендована література.....	301
Кольорові ілюстрації до текстової частини (кольорова вклейка, розміщена після с. 256)	

ПЕРЕДМОВА

Надзвичайна епідемічна ситуація з туберкульозу (ТБ) в країні потребує постійного удосконалення методів виявлення та діагностики захворювань на ТБ серед населення з метою зниження інфікованості, захворюваності та зменшення резервуару туберкульозної інфекції. Захворювання на ТБ у більшості виявлених хворих діагностується не своєчасно, що знижує ефективність лікування, навіть при застосуванні сучасних методів хіміотерапії. Такі хворі становлять велику епідемічну небезпеку для оточення, особливо дітей. Одним із пріоритетних напрямів у системі протитуберкульозних заходів є підвищення рівня знань лікарів з питань своєчасної ефективної діагностики.

Етіологічне підтвердження діагнозу ТБ за допомогою якісних гено-фенотипічних методів досліджень, удосконалення роботи протитуберкульозних лабораторій, епіднагляд за медикаментозною резистентністю (МР) є основою сучасної клінічної фтизіатрії. На бактеріологічні лабораторії покладається особлива функція у питаннях діагностики інфікованих випадків захворювання на ТБ та моніторингу ефективності процесу лікування. З огляду на це важливим напрямом удосконалення та оптимізації роботи лабораторій протитуберкульозної служби (ПТС) є обов'язкова стандартизація основних гено-фенотипічних методів. Упровадження їх у роботу дасть можливість отримати результати, які при порівнянні з результатами досліджень інших лабораторій допоможуть своєчасно виявити та відреагувати на помилки в діагностиці, провести оптимальне специфічне лікування хворих, оптимізувати та полегшити навчання фахівців, оцінити якість роботи лабораторій, окремих фахівців та провести відповідний контроль ефективності лабораторних досліджень. Для реалізації цього напряму в країні підготовлена низка організаційно-розпорядчих, нормативних та навчальних матеріалів з питань структури лабораторної мережі, організації роботи та удосконалення лабораторної діагностики ТБ.

РОЗДІЛ 5

МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ КИСЛОТОСТІЙКИХ БАКТЕРІЙ

Мікроскопічне дослідження мазка мокротиння для виявлення КСБ проводиться з метою виявлення епідеміологічно найбільш небезпечних хворих на туберкульоз легень. Метод мікроскопії є більш швидким, простим і менш витратним методом виявлення КСБ у нативному матеріалі (найчастіше в мокротинні) без попереднього його оброблення і гомогенізації. Завдяки своїм перевагам (швидкість отримання результату, відносна простота, доступність дослідження, економічна ефективність) мікроскопія незамінна для виявлення більшості хворих на туберкульоз легень.

Мікроскопічне дослідження мазків мокротиння, забарвлених за методом Ціля—Нільсена, дозволяє виявити КСБ за умови, що їх кількість становитиме 10 000 і більше в 1 мл мокротиння. Негативний результат не виключає діагноз ТБ, оскільки в мокротинні кількість мікобактерій може бути нижча за межу виявлення методом мікроскопії.

Основним діагностичним матеріалом для мікроскопії на КСБ слугує мокротиння.

Результати мікроскопічного дослідження на КСБ інших біологічних матеріалів (різних рідин, гною, сечі і т. ін.) мають обмежене значення.

Так, дослідження мазків з осаду центрифугованої сечі не завжди дає достовірні результати, оскільки в сечі можуть бути нетуберкульозні мікобактерії (НТМБ), також як у мокротинні. У деяких випадках це пояснюється неправильним збором матеріалу. У мазках з осаду промивних вод шлунка та інших матеріалів можуть виявлятися кислотостійкі сапрофіти, які легко сплутати з *M. tuberculosis*. Тому в разі необхідності виявлення збудника ТБ у різних біологічних матеріалах рекомендують використовувати культуральний метод дослідження.

5.1. Приготування мазків

На практиці використовують 2 методи приготування мазків:

1) метод прямої мікроскопії, коли мазок готується безпосередньо з необробленого діагностичного матеріалу або його осаду, якщо матеріал рідкий;

2) метод мікроскопії мазка з осаду матеріалу, підготовленого для культурального дослідження після розрідження, деконтамінації, концентрації і ресуспендування.

Процедура приготування мазка починається з підготовки предметних скельць. Необхідно використовувати тільки одноразові, нові, знежирені у спирті або суміші Нікіфорова (96 % етиловий спирт + ефір у співвідношенні 1 : 1) скельця без подряпин і сколів.

Скло підписують простим олівцем по матовій смузі або алмазним олівцем по склу. Номер, проставлений на скельці, повинен відповідати номеру дослідження в лабораторному реєстраційному журналі.

Приготування мазків з нативного матеріалу

Контейнер відкривають з обережністю, уникаючи розбрикування аерозолю, що містить мікобактерії.

Мікобактерії частіше виявляються в щільних гнійних грудочках мокротиння.

Обпаленою у полум'ї спиртівки й охолодженою бактеріологічною петлею, одноразовою бактеріологічною петлею або зламаними кінцями дерев'яної палички (нової для кожної порції мокротиння) беруть невелику кількість мокротиння з гнійними грудочками. Щільно притиснувши петлю або паличку перпендикулярно до скла, дрібними круговими рухами розподіляють гнійну грудочку мокротиння по поверхні предметного скельця якомога тоншим шаром площею 1—2 см × 2—3 см у вигляді овалу (рис. 1).

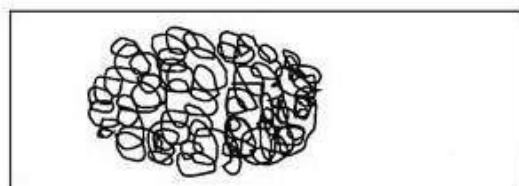


Рис 1. Приготування мазка мокротиння

Товщина мазка у висушеному незабарвленому стані має бути такою, щоб можна було прочитати газетний шриффт, розташований за скельцем на відстані 5—10 см. Якщо мазок занадто тонкий, при мікроскопічному дослідженні можливий хибнонегативний результат; якщо занадто товстий, він може змитися з предметного скельця при забарвленні.

На одному предметному скельці роблять тільки один мазок!

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Використані для приготування мазка палички або одноразову бактеріологічну петлю скидають у ємність із дезінфекційним розчином або у контейнер з відпрацьованим інфекційним матеріалом. Пінцет і ножиці обпалюють у полум'ї пальника (за необхідності).

Приготування мазків для мікроскопічного дослідження є відносно небезпечною процедурою, під час якої може статися розсіювання аерозолів, які містять збудник.

Якщо мазок готують за допомогою бактеріологічної петлі, необхідно обпалювати петлю після кожної маніпуляції в полум'ї спиртового або газового пальника, доки вона не набуде червоного кольору. Перед повторним використанням петлю ретельно прожарюють у полум'ї пальника, яке має бути безбарвним або блакитним. Прийнятніше використовувати одноразові бактеріологічні петлі.

Приготування мазків з осаду діагностичного матеріалу

Готують з отриманого після центрифугування осаду будь-якого рідкого матеріалу (БАЛ, промивні води шлунка, ексудат та ін.). Для приготування мазка до осаду додають 1 мл фосфатного буфера, ресуспендують. На скельце наносять 1—2 краплі ресуспендованого осаду, розподіляючи його тонким шаром в центрі скла на площі приблизно 1—2 см × 2—3 см.

Необхідно пам'ятати, що мазки з осаду рідкого матеріалу легко змиваються у процесі забарвлення. Тому їх бажано готувати на скельцях, заздалегідь оброблених сироваткою або бичачим сироватковим альбуміном, який наносять ватним тампоном на чисті знежирені предметні скельця, рівномірно розподіляючи на 2/3 їх поверхні. Оброблені сироваткою скельця висушують при кімнатній температурі. Скельця готують заздалегідь; термін їх зберігання — до 5 діб.

Не рекомендують готувати мазки способом «розтяжки» матеріалу між двома предметними скельцями. Такий спосіб значно збільшує площу мазка і більше ніж удвічі знижує можливість виявлення КСБ.

Фіксація мазків

Приготовлені мазки висушують при кімнатній температурі до повного висихання у витяжній шафі або ШББ. Не допускається підсушування або фіксація сирих мазків над полум'ям пальника.

Лаборант повинен планувати свій робочий день так, щоб закінчити приготування, фіксацію, забарвлення і перегляд препаратів до завершення робочого дня. Якщо дослідження не вдається закінчити, пред-

метні скельця з мазками залишають на ніч у закритій коробці. Нефіксовані мазки в жодному разі не повинні залишатися відкритими на ніч у робочому приміщенні.

Для фіксації мазків застосовують такі прийоми:

1) скельця з мазками, що висохли, фіксують триразовим проведенням їх упродовж 3—5 с через верхню третину полум'я спиртівки до зникнення ознак запотівання скелець;

2) скельця з мазками, що висохли, поміщають на електронагрівач для сушки предметних скелець при температурі 65—75 °С не менше 1 год;

3) скельця з мазками, що висохли, поміщають у сушарну шафу при температурі 105 °С на 10 хв.

5.2. Забарвлення мазків за методом Ціля—Нільсена

Приготування розчинів

Зразок мокротиння забарвлюють; цей матеріал називають препаратом. Мікобактерії, зокрема *M. tuberculosis*, зберігають забарвлення карболовим фуксином після знебарвлення розчином сірчаної кислоти або солянокислого спирту, тому їх називають кислотостійкими. Для полегшення виявлення кислотостійких організмів проводять дофарбовування фону препарату метиленовим синім.

Барвники, які використовують, нерідко містять різні домішки, тому при приготуванні розчинів барвників треба враховувати вміст фарбувальної речовини. Наважку розраховують шляхом ділення необхідної кількості фарби на десятковий еквівалент вмісту фарбувальної речовини.

Приклад. Треба зважити 3 г фарби, яка містить 75 % (десятковий еквівалент 0,75) фарбувальної речовини. Слід розділити необхідну кількість на вміст фарбувальної речовини: $3 \text{ г} : 0,75 = 4 \text{ г}$. Отже, треба зважити 4 г фарби.

Якщо вміст фарбувальної речовини становить 88 % і більше, пере-рахувати наважку не треба.

Кристали фенолу безбарвні. Якщо вони мають коричневий колір, їх не слід використовувати, оскільки в цьому випадку якість забарвлення може бути незадовільною.

Реактиви:

Забарвлювальний розчин (3 % розчин фуксину).

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Розчин 1. Розчин основного фуксину:

основний фуксин — 0,3 г;
96 % етиловий спирт — 10 мл.

Розчиняють основний фуксин у спирті.

Розчин 2. Розчин фенолу 5 % водний:

кристалічний фенол — 5 г;
дистильована вода — 100 мл.

Повільно нагрівають кристали фенолу у флаконі на водяній бані до утворення рідкого стану і додають злегка підігріту дистильовану воду.

Робочий розчин: змішують 10 мл розчину 1 і 90 мл розчину 2, переливають суміш у ємність із темного скла. Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати при кімнатній температурі впродовж 6 міс. Перед використанням розчин слід профільтрувати.

Знебарвлювальний розчин (3 % розчин солянокислого спирту):

концентрована соляна кислота — 3 мл;
96 % етиловий спирт — 97 мл.

Концентровану соляну кислоту з обережністю додають до спирту у флакон з темного скла. **Забороняється вливати спирт у кислоту!** Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати при кімнатній температурі впродовж 6 міс.

Замість 3 % розчину солянокислого спирту для знебарвлення можна використовувати 25 % розчин сірчаної кислоти.

Знебарвлювальний розчин (25 % розчин сірчаної кислоти):

концентрована сірчана кислота — 25 мл;
дистильована вода — 75 мл.

Концентровану сірчану кислоту з обережністю додають до води, нашаровуючи її по стінці посудини. **Забороняється вливати воду в кислоту!** Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати при кімнатній температурі впродовж 6 міс.

Розчин, що дофарбовує (0,3 % розчин метиленового синього):

хлорид метиленового синього — 0,3 г;
дистильована вода — 100 мл.

Хлорид метиленового синього розчиняють у дистильованій воді. Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і термін збері-

гання. Розчин можна зберігати при кімнатній температурі впродовж 6 міс.

Процедура забарвлення

1. Промарковані і зафіксовані мазки поміщають на підставку («рейки») так, щоб вони не торкалися один одного. Не слід забарвлювати одночасно більше 12 скельць.

2. На кожен мазок накладають смужку фільтрувального паперу. На всю поверхню фільтрувального паперу, що покриває скельце, наливають забарвлювальний розчин.

3. Повільно нагрівають препарат над полум'ям пальника до легкої появи пари. Не допускається закипання або повне випарювання забарвлювального розчину на предметному скельці. Якщо розчину недостатньо, його слід додати і нагрівати ще раз.

4. Прогрітий мазок залишають на 5 хв, не допускаючи повного випарювання рідини, після чого фільтрувальний папір видаляють пінцетом і поміщають у контейнер для відходів.

5. Кожне предметне скельце акуратно змивають під слабкою течією води до повного видалення забарвлювального розчину. Не дозволяється змивати і знебарвлювати одночасно декілька мазків, щоб уникнути перехресної контамінації.

6. На скельця з мазками наливають знебарвлювальний розчин, повністю покриваючи всю поверхню мазка, і залишають на 3 хв.

7. Обережно промивають кожне предметне скельце (див. п. 5).

8. Знебарвлений мазок дофарбовують 0,3 % розчином метиленового синього впродовж 60 с.

9. Промивають скельця водою, видаляють залишки вологи.

10. Залишають препарат на повітрі при кімнатній температурі у вертикальному або похилому положенні для висихання. Не слід промокати препарат.

5.3. Налаштування мікроскопа і методика дослідження препаратів

Шляхом обертання макрогвинта віддаляють об'єктив від предметного столика. Обертаючи револьвер, встановлюють об'єктив з малим збільшенням ($5\times$ або $10\times$) точно над конденсором. Предметне скельце розміщують на предметному столику прямо під об'єктивом. Дивлячись збоку для контролю відстані між скельцем і лінзою об'єктива, повільно

Рекомендована література



Клінічна лабораторна
діагностика: підручник



Медичні аналізи.
Клінічне тлумачення й
діагностичне значення
лабораторних
показників у
загальнолікарській
практиці.

MEDLIT
медична література

КУПИТИ