

## ИНСТРУКЦИЯ ПО УНИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДАМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ, ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ТУБЕРКУЛЕЗА

### I. РОЛЬ ЛАБОРАТОРИЙ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ, ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

Выявление больных туберкулезом проводится при обращении за медицинской помощью и в группах риска по заболеванию туберкулезом.

*Первичное обследование больных возложено на подразделения общей лечебной сети.*

Целью лабораторного исследования является максимально возможное выявление наиболее эпидемически опасной категории пациентов среди лиц, обратившихся в медицинское учреждение с подозрительными в отношении туберкулеза клиническими и/или рентгенологическими симптомами.

Обследования с целью выявления случаев туберкулеза должны осуществляться всеми лечебно-профилактическими учреждениями здравоохранения и включать оценку следующих основных параметров:

- имеющие соответствующую симптоматику со стороны органов дыхания (наличие в течение 3-х и более недель продуктивного кашля с выделением слизистой, слизисто-гнойной мокроты или мокроты с прожилками крови);
- имеющие выявленные лучевыми методами изменения в легких, подозрительные на туберкулез;
- лица из контактов с больными туберкулезом, выделяющими микобактерии и/или имеющими соответствующие симптомы заболевания;
- лица, относящиеся к группам риска.

Под первичным микроскопическим обследованием подразумевается прямая бактериоскопия мазка нативной мокроты, окрашенного по методу *Ziehl-Neelsen* (световая микроскопия) или флюорохромными красителями (люминесцентная микроскопия). Исследование проводится трижды по определенной схеме (см. Приложение № 10 настоящего приказа).

При положительных или сомнительных результатах первичного бактериоскопического обследования, а также при отрицательных, но с наличием клинико-рентгенологических симптомов, пациент направляется в противотуберкулезное учреждение для заключительного микробиологического подтверждения и решения вопроса о взятии на диспансерный учет.

В вопросах диагностики и лечения бактериологические лаборатории противотуберкулезных учреждений должны обеспечить решение следующих задач:

- достоверно подтвердить туберкулезную природу заболевания;
- определить таксономическую принадлежность возбудителя;
- определить его лекарственную чувствительность;
- обеспечить качества лабораторных исследований (разработка и внедрение внутрилабораторного и участие во внешнем контроле качества исследований, непрерывное обучение персонала);
- обеспечить безопасность персонала лабораторий;
- исключить возможность внутрибольничной инфекции;
- осуществлять персонифицированный учет больных туберкулезом и мониторинг состояния микобактериальной популяции в процессе диагностики и лечения;
- осуществлять правильное и своевременное ведение учетно-отчетной документации, а также своевременное доведение результатов исследования до лечебных подразделений;

В основе осуществления всех перечисленных задач лежит использование микробиологических методов исследования.

Классическое микробиологическое исследование включает:

- микроскопическое исследование мазка осадка диагностического материала;
- культуральное исследование (посев);
- дифференциацию выделенной культуры кислотоустойчивых микобактерий;
- определение лекарственной чувствительности выделенного возбудителя.

Весьма важно, что с помощью культурального исследования можно обнаружить значительно меньшее, чем при микроскопии количество микобактерий туберкулеза. Это позволяет на 30 – 50% увеличить число выявляемых бактериовыделителей, повысить чувствительность критерия излечения за счет выявления олигобациллярных больных, продолжающих выделять малые количества микобактерий по окончании курса специфической терапии и признанных излеченными на основании отрицательных результатов микроскопии мазка мокроты.

В связи с изложенным культуральное исследование следует применять во всех случаях диагностики туберкулеза у следующих категорий пациентов:

- Диагностика заболевания у больных с клиническими и рентгенологическими симптомами, подозрительными на туберкулез, при повторно отрицательных результатах бактериоскопического исследования;
  - Диагностика внелегочных форм туберкулеза у взрослых;
  - Диагностика легочных и внелегочных форм туберкулеза у детей;
  - Обследование контингентов групп повышенного риска, имеющих подозрительные на туберкулез симптомы, например, лабораторных работников или медицинских работников, осуществляющих уход за больными туберкулезом, больных с иммунодефицитами;
  - Подтверждение абацилляции больного по окончании курса терапии;
- Кроме того, выделение и оценка возбудителя особенно важна при:
- Наблюдении за больными туберкулезом с неудовлетворительными результатами стандартного курса химиотерапии, у которых возбудителями заболевания могут быть лекарственно-устойчивые штаммы микобактерий туберкулеза или нетуберкулезные микобактерии (возбудители микобактериозов);
  - Эпидемиологическом надзоре за лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза при оценке эффективности программы борьбы с туберкулезом;
  - Выявлении внутрибольничной туберкулезной инфекции и путей ее трансмиссии.

В качестве методов, альтернативных классическому культуральному исследованию, возможно использование автоматизированных и полуавтоматизированных систем ускоренной культуральной диагностики, основанной на использовании жидких питательных сред и различных способах индикации роста микобактерий.

С целью быстрой идентификации микобактерий туберкулезного комплекса в качестве дополнительных допускается использование методов, основанных на амплификации фрагментов генома микобактерий (полимеразная цепная реакция – ПЦР), других молекулярно-биологических методов. ПЦР-анализ может быть применен для исследования материала от больного (мокроты, промывных вод бронхов, мочи и спинномозговой жидкости), а также культур микроорганизмов. Технология проведения ПЦР должна проводиться в строгом соответствии с описанием и инструкцией, прилагаемых к каждому конкретному диагностическому набору (тест-системе). Лаборатории, использующие такие методы, должны быть устроены соответствующим образом для исключения кросс-контаминации образцов.

## II. ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

### 2.1. Сбор диагностического материала

#### 2.1.1. Режимы и кратность обследования больных

Кратность и сроки микробиологических исследований в ходе лечения и наблюдения различных групп пациентов определены в инструкции по химиотерапии больных туберкулезом и инструкции по организации диспансерного наблюдения и учету контингентов противотуберкулезных учреждений.

В микробиологических лабораториях противотуберкулезной службы используется схема, предусматривающая не менее чем 3-кратное в течение 3 последовательных дней исследование мокроты или другого диагностического материала. У впервые выявленных больных (особенно с малыми клиническими формами процесса) желательно по возможности повысить кратность исследования до 4 - 5, так как подобная практика увеличивает число положительных результатов.

Эффективность бактериологических исследований непосредственно зависит от качества диагностического материала. В случаях, если в направлении на исследование указана мокрота, именно этот патологический материал должен быть доставлен и исследован в лаборатории. Материал в виде слюны не должен подменять мокроту.

Никакая хорошо работающая лаборатория не компенсирует плохого качества диагностического материала.

#### 2.1.2. Флаконы для сбора материала

Материал для исследования на кислотоустойчивые микобактерии собирают в стерильные флаконы с удобными, плотно закручивающимися крышками. Применение герметизированных флаконов преследует двоякую цель:

— предотвращение просачивания содержимого и загрязнения окружающей больного среды чрезвычайно стойкими к физическим воздействиям микобактериями и

— предохранение сохраняющегося во флаконе исследуемого материала от загрязнения широко распространенными вегетирующими в окружающей среде кислотоустойчивыми микобактериями.

В связи с этим флаконы для сбора качественного диагностического материала должны отвечать ряду обязательных требований:

— должны быть изготовлены из ударостойкого материала, не допускающего просачивания жидкости; желательно по возможности использовать флаконы одноразового применения, изготовленные из

материала, легко поддающегося плавлению при автоклавировании или сжигании;

- должны иметь плотно закручивающиеся или герметически закрывающиеся крышки;

- объем флаконов должен составлять 20 — 50 мл, что вполне достаточно для проведения всех видов исследований;

- флаконы должны иметь широкое отверстие для сбора мокроты (не менее 35 мм в диаметре), чтобы пациент мог легко сплевывать мокроту внутрь флакона, не подвергая загрязнению наружную поверхность;

- флаконы должны быть изготовлены из прозрачного материала, чтобы можно было оценить количество и качество собранной пробы, не открывая крышку;

- материал, из которого изготовлены флаконы, должен легко подвергаться маркировке и надежно сохранять ее на всем протяжении периода хранения, транспортировки и проведения исследования.

При отсутствии одноразовых контейнеров можно применять толстостенные флаконы из стекла (карманные плевательницы).

При многократном использовании флаконы стерилизуют в автоклаве, удаляют остатки содержимого, тщательно моют, помещают в них стеклянные бусы для гомогенизации мокроты и повторно стерилизуют.

Применения флаконы многократного пользования, во избежание лабораторного загрязнения диагностического материала лаборатория должна постоянно контролировать качество мытья и стерилизации флаконов.

### 2.1.3. Правила сбора диагностического материала

Для получения оптимальных результатов при исследовании диагностического материала необходимо соблюдать следующие условия:

- сбор материала необходимо производить до начала химиотерапии, так как даже несколько дней применения лекарственной терапии может убить значительное количество кислотоустойчивых микобактерий или снизить их жизнеспособность и исказить результаты исследования;

- материал для исследования должен собираться рано утром сразу после подъема пациента;

- при исследовании мокроты желательно собрать не менее 3 проб утренней мокроты в течение 3 последовательных дней. Это существенно повышает результативность исследования;

- собранный материал необходимо как можно быстрее доставить в лабораторию; в случае невозможности немедленной доставки материал сохраняется в холодильнике при 4-10°C;

- при перевозке материала необходимо особенно тщательно следить за сохранностью флаконов и правильностью их маркировки.

### 2.1.4. Виды диагностического материала

Так как наиболее частой формой туберкулезного поражения является туберкулез органов дыхания, основным материалом исследования составляют мокрота и другие виды отделяемого трахеобронхиального дерева.

При легочных формах туберкулеза чаще всего исследуют следующие материалы: мокроту; отделяемое верхних дыхательных путей, полученное после аэрозольных ингаляций; промывные воды бронхов; бронхоальвеолярные смывы; материал, получаемый при бронхоскопии, транстрахеальной и внутрилегочной биопсии; аспират из бронхов; ларингеальные мазки; экссудаты; мазки из торакальных ран; промывные воды желудка (преимущественно у детей).

**Мокрота.** У пациентов, выделяющих мокроту в достаточном количестве, для исследования собирают ее утреннюю порцию. Качественным материалом можно считать мокроту, имеющую слизистый или слизисто-гнойный характер, а также содержащую плотные белесоватые включения. Желтоватый, серый или бурый цвет мокроты позволяет предположить диагностическую ценность материала. Достаточный объем исследуемой порции мокроты составляет 3 - 5 мл, однако допустимо исследование и меньших по объему порций. Некоторые больные выделяют микобактерии нерегулярно, поэтому в целях повышения информативности практикуется повторное (до 3 раз) исследование мокроты. Такая тактика позволяет повысить число положительных находок.

Сбор мокроты для исследования на кислотоустойчивые микобактерии - весьма ответственный этап диагностической процедуры, от четкости проведения которого во многом зависит результат исследования.

При сборе мокроты необходимо иметь в виду, что в момент ее откашливания создается высокий риск воздушно-капельного распространения инфекции. В связи с этим желательно, чтобы сбор мокроты производился в специально выделенном для этих целей отдельном хорошо вентилируемом помещении, оснащенном бактерицидной лампой и средствами дезинфекции, или на открытом воздухе. В промежутках между посещениями отдельных пациентов помещение должно хорошо вентилироваться, чтобы избежать или значительно снизить риск нозокомиального инфицирования.

Сбор мокроты должен производиться в присутствии и при непосредственном участии медицинского работника. Лицам, ответственным за сбор мокроты, необходимо руководствоваться следующими правилами:

1. Лицам, ответственным за сбор мокроты, следует объяснить пациенту причины исследования и необходимость откашливать не слюну или носоглоточную слизь, а содержимое глубоких отделов дыхательных путей, что достигается в результате продуктивного кашля, возникающего после нескольких глубоких вдохов.

2. Необходимо предупредить пациента, что он должен предварительно почистить зубы и прополоскать полость рта кипяченой водой, что позволяет механически удалить основную часть вегетирующей в ротовой полости микрофлоры и остатки пищи, загрязняющие мокроту и затрудняющие ее обработку.

3. Участвующий в сборе мокроты медицинский работник в маске, резиновых перчатках и резиновом фартуке должен находиться за спиной пациента, выбирая свое положение таким образом, чтобы направление движения воздуха было от него к пациенту. Медицинский работник должен открыть стерильный флакон для сбора мокроты, снять с него крышку и передать его пациенту.

4. Стоя позади пациента, следует рекомендовать ему держать флакон как можно ближе к губам и сразу же сплевывать в него мокроту по мере ее откашливания. Выделение мокроты усиливается после одного или нескольких глубоких вдохов.

5. По завершении сбора мокроты медицинский работник должен закрыть флакон крышкой, оценить количество и качество собранного материала, занести эти данные в направление. Флакон с собранной порцией мокроты тщательно закрывают заворачивающейся крышкой, маркируют и помещают в специальный бикс или ящик для транспортировки в лабораторию.

Если же пациент не выделяет мокроту или выделяет ее только эпизодически и в скудном количестве, то накануне вечером и рано утром в день сбора мокроты следует дать больному отхаркивающее средство или применить раздражающие ингаляции. Собранный таким образом материал не подлежит консервации и должен исследоваться в день сбора.

Для аэрозольных ингаляций пользуются портативными или стационарными аэрозольными ингаляторами. Для ингаляций рекомендуется раствор, в 1 л которого содержится 150 г хлорида натрия ( $NaCl$ ) и 10 г двууглекислого натрия ( $Na_2CO_3$ ). Для приготовления раствора используется стерильная дистиллированная вода. Для провокации мокроты необходимо вдохнуть на протяжении 10 — 15 минут от 30 до 60 мл подогретой до 42 – 45°C смеси. Так как вдыхаемый во время процедуры ингаляции раствор вызывает усиленную саливацию еще до появления кашля и отделения мокроты, в первые минуты после завершения процедуры ингаляции пациент должен сплюнуть слюну в специально приготовленный лоток с 5% раствором хлорамина (или другого дезинфицирующего средства) и только после этого собрать мокроту для исследования.

В связи с тем, что аэрозольная ингаляция вызывает выделение водянистого секрета, напоминающего по консистенции слюну, во избежание выбраковки материала в бланке направления и на флаконе с материалом должна быть обязательная маркировка, указывающая на то, что материал получен после аэрозольной ингаляции.

У большинства пациентов после аэрозольной ингаляции в течение нескольких часов наблюдается остаточная гиперсекреция бронхиального отделяемого, поэтому пациенту рекомендуется в

течение суток после ингаляции собрать мокроту для второго исследования.

При отсутствии мокроты, невозможности проведения аэрозольной ингаляции или безуспешности этой процедуры для исследования на микобактерии берут промывные воды бронхов или желудка.

**Промывные воды бронхов.** Сбор промывных вод бронхов производится врачом-отоларингологом, Пациенту во время вдоха вводят шприцем в трахею 5—7 мл стерильного изотонического раствора, который вызывает кашлевой рефлекс. При этом вместе с изотоническим раствором откашливается секрет из глубоких отделов бронхиального дерева. Промывные воды бронхов собирают в стерильный флакон и немедленно направляют в лабораторию.

Пациентам с выраженным глоточным рефлексом указанную процедуру производят после предварительной анестезии надгортанника, гортани и задней стенки глотки.

При отсутствии мокроты или невозможности ее получения наиболее ценными диагностическими материалами являются получаемые при бронхологическом исследовании аспираты из трахеи и бронхов, бронхоальвеолярная лаважная жидкость (БАЛ), а также материалы прицельной катетер- и щеточной биопсии.

**Промывные воды желудка** исследуют преимущественно у детей младшего возраста, которые плохо откашливают мокроту и часто проглатывают ее. Во избежание смешивания проглоченной мокроты с пищей промывные воды желудка следует брать натощак. Последний прием пищи должен быть не менее чем за 12 часов до взятия промывных вод желудка. Перед сбором материала для нейтрализации желудочного содержимого больному дают выпить 100 — 150 мл раствора питьевой соды (1 чайная ложка соды на 1 стакан воды), приготовленного на стерильной дистиллированной воде для исключения возможности попадания в желудок кислотоустойчивых сапрофитов, которые могут содержаться в водопроводной воде. После этого вводят желудочный зонд и собирают содержимое желудка в стерильный флакон. Материал немедленно доставляют в лабораторию и подвергают обработке, чтобы исключить повреждающее влияние на возбудителя содержащихся в материале желудочных ферментов.

Особенно результативен метод получения промывных вод желудка в сочетании с предварительной аэрозольной ингаляцией. Промывные воды желудка следует собирать через 30 мин после аэрозольной ингаляции. Такая комбинация двух указанных методов дает значительно больший процент положительных результатов, чем каждый из них в отдельности. Этот метод получения диагностического материала может оказаться полезным также у пациентов с подавленным кашлевым рефлексом, у которых не удается получить материал даже при провоцирующих ингаляциях.

При внелегочных формах заболевания микобактерии могут поражать практически любой орган, поэтому для исследования пригоден самый разнообразный материал: спинномозговая, плевральная, перикардальная, синовиальная и асцитическая

жидкость, кровь, гной, пунктаты костного мозга, резецированные ткани, гнойно-некротические массы, соскобы синовиальных оболочек, биопсийный материал лимфатическим узлов.

При внелегочных формах процесса можно выделить 2 группы диагностических материалов:

- асептически полученный материал, обычно свободный от загрязняющей сопутствующей микрофлоры, и
- заведомо загрязненный материал из открытых очагов поражения, в отношении которого заранее известно, что он контаминирован сопутствующей микробной флорой или собран без соблюдения правил асептики.

*Все жидкие материалы подлежат обязательному центрифугированию. Все последующие манипуляции выполняются с полученным осадком.*

Все жидкие материалы во избежание свертывания сразу же после их получения переносят в стерильный флакон и смешивают с равным объемом стерильного 3% раствора лимоннокислого натрия.

**Кровь и другие жидкие материалы** с большой примесью крови после добавления 3% раствора лимоннокислого натрия центрифугируют при 3000 g, и осадок 3 раза отмывают стерильной дистиллированной водой.

Если асептически собранный жидкий материал не может быть немедленно доставлен в лабораторию, к нему добавляют стерильный 10% раствор щавелевокислого калия из расчета 0,01 - 0,02 мл на 1 мл материала или гепарин из расчета 0,2 мг на 1 мл.

**Асептически собранный тканевый материал** чаще всего состоит из полученных при биопсиях или оперативных вмешательствах резецированной ткани того или иного органа, гнойно-некротических масс, грануляций, соскобов синовиальных оболочек, лимфатических узлов или пунктатов их содержимого. Материал помещается в стерильный флакон без консервантов и немедленно доставляется в лабораторию. Если материал не может быть немедленно доставлен в лабораторию, во избежание высыхания к нему добавляется небольшое количество стерильного изотонического раствора, и он помещается в холодильник при 4-10°C или во флакон с сухим льдом.

Асептически собранный материал засеивается на питательные среды без предварительной деконтаминации.

В случаях, когда неизвестно, насколько при сборе материала соблюдались правила асептики, желательно перенести его в стерильную ступку со стерильным песком, тщательно измельчить стерильными ножницами, добавить 0,5-1,0 мл стерильного изотонического раствора и энергично растереть до получения однородной массы, постепенно доводя объем добавляемого изотонического раствора до 4-5 мл. Полученная масса отстаивается в течение 1-2 минут и затем отбирается надосадочная жидкость.

Половину полученной жидкости без обработки засеивают на питательные среды и используют для приготовления мазка. Вторую половину деконтаминируют по стандартному методу и также засеивают на питательные среды.

**Заведомо загрязненные материалы.** К этой категории относится большинство ниже перечисленных материалов, а также основной и наиболее доступный при мочеполювом туберкулезе материал — моча.

**Моча** (средняя часть утренней порции или вся утренняя порция) собирается в стерильную посуду после тщательного туалета наружных половых органов. Анализ мочи на микобактерии должен предусматривать обязательное трехкратное исследование. В лаборатории мочу центрифугируют, используя метод накопления осадка. Особенностью существования *M. tuberculosis* в жидкостях является способность их долгое время находиться во взвешенном состоянии. В связи с этим рекомендуется производить центрифугирование при 3000 g всего материала а не его донной фракции, получаемой после отстаивания в естественных условиях.

Сбор суточной мочи для бактериологического исследования не практикуется. Это объясняется тем, что при накоплении мочи в течение суток невозможно сохранить ее стерильность. Хранение емкости с мочой в холодном месте может привести к выпадению солей, что неблагоприятно отражается на последующей обработке осадка. Кроме того, в моче содержатся бактерицидные продукты, которые могут не только угнетать жизнеспособность микобактерий, но в течение суток даже разрушать микробные клетки. В то же время при длительном хранении мочи невозможно избежать размножения в ней гнилостной и гноеродной микрофлоры. Установлено, что при хранении мочи более 1 часа после сбора число микробных клеток неспецифической гноеродной и гнилостной микрофлоры увеличивается в несколько раз. Ферменты жизнедеятельности этой флоры могут угнетать способность микобактерий к росту. И, наконец, при сборе мочи в течение длительного времени следует иметь в виду возможность попадания в нее кислотоустойчивых сапрофитов, что может привести к диагностическим ошибкам. В этом отношении особенно осторожно должны оцениваться результаты исследования мочи, полученной от мужчин, так как в ней могут обнаруживаться *Mycobacterium smegmatis* и другие нетуберкулезные микобактерии, которые ошибочно могут быть приняты за микобактерии туберкулеза.

**Менструальная кровь.** Исследование менструальной крови требует особого методического подхода. Наличие в этом материале большого количества протеолитических, фибринолитических и других ферментов обуславливает необходимость незамедлительной доставки материала в лабораторию и тщательной его обработки, так как менструальная кровь, с одной стороны, является весьма подходящим материалом для развития гноеродной и гнилостной флоры, а с другой — благодаря обилию ферментов, неблагоприятно влияет на жизнеспособность микобактерий. Менструальную кровь следует собирать не тампоном, а вакуумным отсосом или колпачком Кафки.

Исследуют ее так же, как кровь или другие материалы с примесью крови.

Каловые массы собирают в стерильную посуду. Для посева небольшое количество кала (1 г) измельчают в ступке с 3-5 мл дистиллированной воды, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, центрифугируют и исследуют полученный осадок. Бактериологическое исследование кала производят редко, так как обычно положительный результат получить не удается.

Если у больного заподозрена внелегочная форма туберкулеза, помимо других видов диагностического материала желательно также исследовать и мокроту, так как это существенно повышает частоту выявления сочетанных легочных и внелегочных форм туберкулеза.

Противотуберкулезные препараты или их активные метаболиты в ходе химиотерапии могут присутствовать в диагностическом материале и влиять на высеваемость микобактерий. Большинство противотуберкулезных препаратов выводится из организма с мочой, поэтому можно встретить рекомендации по отмене препаратов на 2-3 суток перед сбором материала для того, чтобы секретирующие клетки и мочевыводящие органы полностью очистились от лекарственных средств. Однако такая отмена должна быть рациональной, основанной на фармакокинетике препарата или его производных. Для исключения влияния химиопрепаратов в диагностическом материале на рост микобактерий рекомендуется использовать процедуру отмывки осадка материала дистиллированной водой или стерильным физиологическим раствором.

Исследование поверхностей различных материалов применяется для контроля качества дезинфекционных мероприятий, а также при обследовании очагов туберкулезной инфекции в эпидемиологических целях. Метод основан на определении загрязненности поверхностей различных предметов микобактериями путем взятия смывов стерильным тампоном из мелкопористой поролоновой губки размером 15 мм х 15 мм х 15 мм.

Наиболее опасными объектами, подлежащими обязательному исследованию на загрязненность микобактериями, являются поверхности, находящиеся в зоне дыхания больного в палатах, кабинетах и местах наибольшего скопления больных (туалетах, процедурных кабинетах), а также оборудование кабинетов для ингаляций, бактериологических лабораторий, кабинетов для сбора мокроты.

Перед проведением смывов необходимо определить, с каких предметов они будут взяты и в каком количестве. Площадь исследования поверхности материала зависит от вида этого материала (см. Таблицу 1).

Таблица 1.

### Параметры исследования поверхностей различных материалов

Группа	Материал	Минимальная площадь смыва	Необходимое кол-во смывов
I	Стекло, металл, эмаль, керамика	500 см <sup>2</sup>	5
II	Поверхности, покрытые синтетическими лаками, масляной, вододисперсионной и другими красками	1000 см <sup>2</sup>	10
III	Пластмасса, полистирол, плексиглас, линолеум, кожзаменитель	1500 см <sup>2</sup>	15
IV	Хлопчатобумажные и шерстяные ткани	2000 см <sup>2</sup>	20

На однократное исследование требуется 45 - 50 тампонов. Одним тампоном берут смыв в одной точке площадью 100 см<sup>2</sup> (например, с квадрата 10 см х 10 см). Для взятия смывов используют стерильные трафареты из алюминиевой или другой металлической проволоки размером 10 см х 10 см. Если площадь исследуемого объекта меньше 100 см<sup>2</sup>, то смыв берут одним тампоном с нескольких предметов, изготовленных из одного материала: с двух вентилях кранов, с трех дверных ручек и т.п. Для исследования предметов, имеющих изогнутую поверхность (раковина и т.п.), однократно используют гибкие бумажные трафареты.

При заборе материала стерильный поролоновый тампон берут стерильным пинцетом, погружают в пробирку с 5 мл 5% раствора трехзамещенного фосфорнокислого натрия, слегка отжимают о внутреннюю стенку пробирки и производят смыв с поверхности предмета, после чего тампон снова погружают в смачивающий раствор. Пинцет перед очередным смывом стерилизуют обжиганием над пламенем спиртовки. Пробирки маркируют и отправляют в лабораторию с сопроводительной документацией, где указывают дату проведения исследования, название учреждения и предметы, с которых взяты смывы.

### 2.2. Консервация и транспортировка диагностического материала

Собранный диагностический материал должен как можно быстрее централизованно доставляться в лабораторию. Доставка должна осуществляться 1 или 2 раза в неделю при условии обязательного сохранения материала в промежутках между доставками в холодильнике или с применением консервантов. Флаконы до момента отправки хранятся в отведенном для этих целей холодильнике или

специальном контейнере, который по окончании каждого рабочего дня опечатывается и запирается.

### 2.2.1. Консервация

Диагностический материал, подлежащий в дальнейшем культуральному исследованию, не должен храниться в холодильнике (4-8°C) более 48-72 часов без применения консервирующих средств.

Наиболее приемлемые результаты достигаются при использовании одного из перечисленных ниже консервантов, которые добавляются к собранной мокроте в двукратном объеме:

- 10 % водный раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия ( $Na_3PO_4$ ) — 3-5 суток;
- 0,05-0,1 % раствор хлоргексидина биглюконата (ХГГ) — 3-5 суток;
- 2-3 % раствор борной кислоты — до 3 суток;

При использовании перечисленных консервантов материал сохраняется при комнатной температуре. Однако для снижения их токсичности в отношении микобактерий пробы рекомендуется сохранять в холодильнике при температуре от 4 до 8°C.

В день поступления материала в лабораторию консервированный материал центрифугируют, не подвергая обычной процедуре предварительной обработки. Осадок при необходимости нейтрализуют и засевают на питательные среды, одновременно приготавливая мазки для световой или люминесцентной микроскопии.

### 2.2.2. Транспортировка

Во время транспортировки диагностический материал должен предохраняться от воздействия прямых солнечных лучей и тепла. В летний период (особенно в районах с теплым климатом) консервация необходима, если транспортировка занимает более 24 часов. В условиях Крайнего Севера диагностический материал при длительной транспортировке может подвергаться воздействию значительных колебаний температуры. При этом необходимо иметь в виду, что допускается пересылка материала в замороженном состоянии без консервации. Однако ни в коем случае нельзя допускать повторное замораживание после оттаивания материала, так как это способствует снижению жизнеспособности микобактерий.

Для транспортировки материала рекомендуется пользоваться биксами или специальными транспортировочными ящиками (контейнерами) с мягкими легко стерилизующимися прокладками на дне или с прокладками для флаконов или пробирок. Флаконы или пробирки (желательно пластиковые одноразового использования) с диагностическим материалом должны быть плотно закупорены или снабжены завинчивающимися крышками с прокладками.

Во избежание протечки жидких материалов и нарушения целостности флаконов они должны быть закреплены в

транспортировочных ящиках в вертикальном положении и снабжены прокладками, предохраняющими их от повреждения. Прокладки должны быть выполнены из материалов, обладающих высокой адсорбционной способностью с тем, чтобы в случае протечки они могли адсорбировать жидкость и ограничить участок загрязнения в пределах транспортировочного контейнера.

Мазки для микроскопического исследования транспортируются в специальных планшетах. Для предохранения от перекрестной контаминации они не должны соприкасаться друг с другом.

Каждая проба материала должна быть промаркирована и иметь индивидуальное направление, а вся партия — заполненный сопроводительный лист. Последний заполняется в 2-х экземплярах: один заполненный и подписанный сотрудником, ответственным за отправку материала, остается в лаборатории, второй экземпляр с подписью сотрудника, принявшего материал для исследования, возвращается в учреждение, направившее материал.

Во избежание инфицирования сопроводительного листа и бланков индивидуальных направлений желательно помещать их в чистый конверт или полиэтиленовый пакет и передавать непосредственно в руки водителю автотранспорта, а затем медицинскому работнику, принимающему материал.

*Категорически запрещается заворачивать флакон с материалом в бланк направления, что необходимо объяснить больным и медицинскому персоналу, занятому сбором, подготовкой и транспортировкой проб.*

На всех этапах сбора, оформления сопроводительных документов, хранения и транспортировки материала сотрудники лаборатории должны проводить инструктаж лиц, непосредственно ответственных за сбор диагностического материала, контролировать его качество, правильность консервации и транспортировки и своевременность доставки в лабораторию.

При поступлении материала, не отвечающего вышеуказанным требованиям, а также при отсутствии направления или маркировки (этикетки) на флаконе с материалом он подлежит уничтожению с обязательным извещением об этом учреждения, направившего материал. Перечисленные вопросы находятся в компетенции руководителя лаборатории.

Обычно используют один из следующих принципов централизованной доставки диагностического материала:

- автотранспортом лаборатории "на себя" или
- автотранспортом обслуживаемого учреждения "от себя".

В обоих случаях должен быть составлен и согласован график транспортировки материала. Водитель машины должен быть обучен правилам обращения с инфекционным материалом, иметь флакон с

дезинфицирующим средством и ватные тампоны на случай аварийной протечки материала.

График работы сотрудников лаборатории должен предусматривать прием, регистрацию и немедленную обработку доставленного машиной контейнера, а также выдачу взамен стерильной посуды и пр. Возможна передача ответов предыдущих анализов.

Перед отправлением транспортного средства, перевозящего материал, а также при приеме доставленного материала в лаборатории обязательна проверка следующих положений:

- число доставленных в лабораторию флаконов с материалом должно соответствовать их числу, указанному в сопроводительном листе;
- идентификационный номер пробы материала должен быть нанесен на этикетку или боковую поверхность контейнера с материалом; во избежание ошибок при последующих манипуляциях не допускается нанесение маркировки на крышку флакона;
- идентификационный номер маркировки каждого флакона с материалом должен точно соответствовать номеру, указанному в сопроводительном листе;
- каждая проба материала должна иметь заполненный бланк направления с указанием характера необходимого исследования;
- каждая партия материала должна иметь сопроводительный лист, в котором должны быть указаны необходимые данные каждого пациента (*см. Приложение №10 (приложение №3) настоящего приказа*);
- необходимые данные каждого пациента;
- отметки об удаленных и некачественных пробах;
- дата и время отправки материала;
- дата и время получения материала;
- подпись сотрудника, ответственного за отправку;
- подпись сотрудника, принявшего материал для исследования.

### 2.3. Хранение и транспортировка культурального материала.

Выделенные из диагностического материала культуры микобактерий должны быть доставлены из бактериологических лабораторий 1-го уровня в лаборатории 2-го или 3-го уровня для дальнейшей дифференциации, видовой идентификации, определения лекарственной чувствительности.

Отобранные в пробирках культуры проверяют на кислотоустойчивость и по срокам роста. Пробирки с культурой проверяют на отсутствие сколов и трещин, маркируют дважды несмываемым маркером. Плотной укупоренной герметичной пробкой сохраняют всю пробирку целиком с косяком среды и культурой. Хранение осуществляют в специально отведенном для этих целей холодильнике, снабженного замком и опечаткой, при 4-6°C. В

таком виде культура микобактерий на косяке плотной питательной среды сохраняет свою жизнеспособность более месяца.

Каждая промаркированная пробирка с культурой должна сопровождаться специально разработанным бланком, на котором отмечены:

- данные учреждения-отправителя;
- индивидуальный лабораторный номер (маркировка);
- паспортные данные на пациента;
- регистрационный районный номер;
- цель исследования;
- режимы лечения;
- название материала;
- дата посева и дата снятия материала;
- данные по кислотоустойчивой окраске выделенной культуры;
- скорость и массивность роста на *каждой* из использованных питательных сред;
- название питательной среды в передаваемой пробирке;
- окраска колоний.

Подлежащий пересылке собранный культуральный материал оформляют в виде партии отправки и сопровождают документом на всю партию подобно транспортировочному бланку на диагностический материал. Этот документ должен включать:

- данные учреждения-отправителя;
- данные учреждения-получателя;
- данные на больного и соответствие маркировок пробирок;
- дату выборки, после которой культура была направлена на хранение в холодильнике (дата снятия культуры).
- дата и время отправки материала;
- дата и время получения материала;
- подпись сотрудника, ответственного за отправку;
- подпись сотрудника, принявшего материал для исследования.

Партию культурального материала упаковывают согласно санитарным правилам (СП 1.2.036-95) Госкомсанэпиднадзора России. Транспортировочный контейнер маркируют знаком «Биологическая опасность». Для свободного перемещения необходимо оформить сопроводительное письмо на официальном бланке. Организация-отправитель должна сообщить срочной связью получателю дату и вид транспорта, которым отправлена посылка. При необходимости для исключения всех видов досмотра и контроля оформляют справку по специальной форме вышеуказанных санитарных правил.

При транспортировке культурального материала соблюдают температурный режим от +1° до +30° С, бережное обращение с грузом, вертикальное положение. Порядок транспортировки, инструктаж, оформление поступающей и отправляемой сопроводительной документации аналогичен транспортировке диагностического материала.

## 2.4. Правила работы с диагностическим материалом

### 2.4.1. Общие правила устройства лаборатории

При организации микробиологических исследований необходимо руководствоваться санитарными правилами Российской Федерации и помнить, что к работе с возбудителем туберкулеза допускаются учреждения, имеющие специальное разрешение на работу с микроорганизмами III–IV группы патогенности. Это связано с высоким риском заболевания среди сотрудников микробиологических подразделений. Устройство лаборатории, расположение и организация рабочих мест должны предотвращать как развитие внутрибольничной туберкулезной инфекции, так и контаминацию рабочих мест, а также обеспечивать необходимые меры безопасности при работе персонала с возбудителем туберкулеза.

Необходимые мероприятия должны включать:

- а) административные меры, предотвращающие распространение инфекционных аэрозолей из загрязненных зон в неинфицированные помещения лаборатории и лечебного учреждения в целом;
- б) инженерные (проектные и технические) мероприятия, направленные на снижение концентрации инфекционных аэрозолей в воздухе (принудительная вентиляция, использование специализированных устройств обеззараживания воздуха);
- в) меры персональной защиты органов дыхания персонала (защитные маски, респираторы). Указанные меры приведены в последовательности убывания их эффективности. Например, персональная респираторная защита малоэффективна при отсутствии административных мер и мер, направленных на снижение концентрации инфекционных аэрозолей в воздухе рабочих помещений.

Административные меры включают:

- разделение лаборатории на заразную и чистую зоны; создание эпидемиологической цепочки последовательного движения исследуемых материалов в процессе приема, обработки и исследования;
- соответствующее назначение помещений лаборатории; соблюдение норм санитарно-гигиенических мероприятий и выбор адекватных дезинфицирующих средств, имеющих соответствующую документацию, регламентирующую методы применения средств в лабораториях противотуберкулезных учреждений;
- образовательную подготовку персонала, включающую представление о путях трансмиссии микобактерий туберкулеза и мерах профилактики;
- соблюдение правил сбора материала (в первую очередь, мокроты);

- выбор методик, сокращающих время работы с заразным материалом и повышающих безопасность лабораторных манипуляций.

Инженерные меры. По мере возрастания сложности инженерные мероприятия условно делятся на следующие группы:

- 1) удаление и обмен воздуха в помещениях путем естественной вентиляции, что допустимо лишь для неинфицированных помещений;
- 2) организация принудительной вентиляции воздуха в помещениях и на рабочих местах (общая и локальная вентиляция), исключающей попадание инфекционного аэрозоля в коридоры и другие смежные помещения;
- 3) удаление или обеззараживание инфекционного аэрозоля, находящегося в воздухе помещений, с использованием технических средств (фильтрация воздуха, воздействие на микроорганизмы, приводящее к их уничтожению и гибели).

Общая принудительная вентиляция (приточная, вытяжная или приточно-вытяжная) должна обеспечивать удаление загрязненного (инфицированного) воздуха из помещения и отсутствие в помещениях застойных зон.

Локальная вентиляция должна обеспечивать удаление инфицированного воздуха из зоны работы с инфекционным материалом и поступление чистого (неинфицированного) воздуха. Она может осуществляться с помощью локальных вытяжных зонтов, колпаков, вытяжек и других технических устройств. При работе с инфекционным материалом локальные вытяжные установки должны быть оснащены бактерицидными фильтрами или другими устройствами, предотвращающими выброс инфекционного аэрозоля наружу.

Обеззараживание воздуха и системы рециркуляции воздуха внутри помещений. Системы обеззараживания воздуха должны обеспечивать снижение концентрации инфекционного аэрозоля в воздухе и поддержание ее на заданном нормативными документами уровне. Устройства обеззараживания воздуха могут использоваться как в системе общей вентиляции, так и в автономных устройствах рециркуляции воздуха в помещении. Их использование должно осуществляться в строгом соответствии с инструкциями. Например, эффективность работы ультрафиолетовых облучателей снижается во много раз при облучении загрязненных поверхностей, высокой влажности воздуха (после влажной уборки).

При использовании фильтрующих устройств необходимо контролировать состояние фильтров и осуществлять их своевременную замену и утилизацию. Кроме того, такие устройства должны гарантировать высокую эффективность фильтрации инфекционного аэрозоля и во избежание возможности вторичного попадания отфильтрованного инфекционного аэрозоля в воздух помещения должны работать непрерывно.

Устройства, инактивирующие микроорганизмы, должны обеспечивать разрушение микробных клеток в процессе обработки

воздуха и не оказывать отрицательного влияния на воздушную среду, материалы, оборудование и человека.

В связи с этим такие установки должны иметь необходимые документы, разрешающие их использование в противотуберкулезных учреждениях, а также методическую документацию по правилам эксплуатации и рекомендации по их использованию в помещении. К числу таких систем относятся шкафы биологической защиты (ламинарные шкафы), фильтрующие или обеззараживающие устройства и/или приборы, сочетающие указанные функции.

Индивидуальная защита органов дыхания. Защитные персональные маски типа матерчатых или бумажных хирургических предотвращают распространение микроорганизмов, захватывая крупные жидкие частицы около рта или носа, но не обеспечивают защиту от вдыхания подсохших капельных ядер аэрозолей.

Респираторы — это специальные виды масок безопасности. Они плотно прилегают к лицу, предотвращая просачивание воздуха через боковые отверстия. Медицинским работникам противотуберкулезных учреждений и лабораторий рекомендуется использовать респираторы, обеспечивающие 95%-ную задержку аэрозольных частиц диаметром 0,3 мкм. Эффективность респираторов снижается при увлажнении и загрязнении, поэтому их хранят завернутыми в чистую ткань, а не в сохраняющих влагу пластиковых пакетах.

#### *2.4..2. Правила приема диагностического материала*

Поступающие для исследования пробы материала принимают на отдельном столе, соблюдая следующие правила:

- прием поступающих проб и их осмотр следует, по возможности, проводить в одноразовых перчатках и масках;
- перед тем, как открыть транспортировочный контейнер, необходимо протереть его наружную поверхность тампоном, смоченным соответствующим дезинфицирующим средством (например, 5% раствором хлорамина или гипохлорита);
- аккуратно открыть крышку контейнера и проверить, нет ли следов протечки материала на поверхности флаконов. Ни в коем случае не использовать поврежденные флаконы (разбитые или с трещинами) — уничтожить их (автоклавирование или кипячение) и запросить новый образец, отметив в сопроводительном бланке;
- проверить наличие идентификационных номеров на флаконах с материалом и сверить их с номерами в сопроводительных документах;
- продезинфицировать внутреннюю поверхность транспортировочного контейнера;
- после работы с флаконами уничтожить одноразовые перчатки и вымыть руки с мылом;
- выдать водителю обменную стерильную посуду;
- подписать сопроводительные документы;

- занести в регистрационный лабораторный журнал сведения о каждом пациенте и полученном от него материале.

Бланки направлений следует подвергнуть направлений стерилизации в сухожаровом шкафу в течение 30 минут при 85°C.

#### *2.4.3. Оценка качества и количества мокроты*

При исследовании мокроты пациентов с подозрением на туберкулез понятие «качественная мокрота» имеет конкретное определение. Качественной является свежевыделенная мокрота из глубоких отделов дыхательных путей с минимальными примесями слюны или носоглоточной слизи. Наилучшим для исследования считают образец мокроты, в котором имеются слизистые или слизисто-гнойные комочки, белесоватые включения. Сероватый, желтоватый или бурый цвет мокроты также может характеризовать качественный материал. Для исследования достаточно 3-5 мл мокроты, но хорошие результаты могут быть получены и при исследовании меньших объемов мокроты.

Индукционная, т.е. полученная при аэрозольных ингаляциях или других манипуляциях, мокрота напоминает по внешнему виду и консистенции слюну. Важно, чтобы этот материал по ошибке не был удален как непригодный для исследования. Поэтому в сопроводительном документе необходимо отмечать, каким образом получен материал для анализа.

#### *2.4.4. Техника безопасности при работе с диагностическим материалом*

При работе с заразным материалом необходимо иметь в виду, что работа с диагностическим материалом является одним из самых опасных этапов микробиологического исследования. Туберкулез распространяется воздушно-капельным путем через содержащие возбудитель мельчайшие аэрозольные частицы, диаметр которых составляет 1 - 5 мкм. Именно эти мельчайшие частицы составляют ту фазу аэрозоля, которая способна при дыхании проникать в легочные альвеолы и оседать в них, формируя начало инфекционного процесса. В лабораторной работе усилия должны быть направлены на то, чтобы избежать или свести к минимуму опасность заражения во время тех манипуляций, при выполнении которых наблюдается наибольшая вероятность образования и рассеивания потенциально опасных инфекционных аэрозолей.

*В лабораториях основными источниками образования инфекционных аэрозолей являются манипуляции, связанные с обработкой зараженного материала*

Аэрозоли могут образовываться при выполнении следующих манипуляций:

- открывание флаконов с материалом; эта манипуляция особенно опасна, если между наружной стенкой горлышка флакона и внутренней поверхностью крышки находятся частицы высохшей мокроты или если непосредственно перед открыванием флакон подвергался встряхиванию во время транспортировки;

- приготовление мазков путем нанесения материала на предметное стекло и распределение его по поверхности стекла;

- прожигание над пламенем горелки неочищенных от остатков материала бактериологических петлей;

- попытки фиксировать над горелкой невысохший влажный мазок, что приводит к вскипанию и разбрызгиванию частичек материала;

- работа с жидкими культурами или с надсадочной жидкостью;

- забор в пипетку суспензии микроорганизмов, особенно при использовании автоматических пипеток с фиксированным объемом жидкости;

- использование высокоскоростных встряхивателей и центрифуг;

- энергичная инокуляция микробных суспензий в пробирки или флаконы;

- повреждение пробирок при центрифугировании;

- использование ступок при растирании инфицированного материала;

- приготовление суспензий микобактерий для инокулирования (особенно опасно использование ступок для растирания культуры).

При выполнении всех этих манипуляций следует соблюдать особую осторожность, а некоторые желательно исключить из лабораторных технологий.

Для предупреждения случаев внутрилабораторного заражения необходимо свести к минимуму возможность образования аэрозолей. Для защиты лабораторных работников от инфекционных частиц необходимо проводить работу при включенной локальной вытяжной вентиляции (там, где это достаточно) или в специально оборудованных боксах или ламинарных шкафах.

### III. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КИСЛОУСТОЙЧИВЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

Присутствие кислотоустойчивых микобактерий в клиническом материале может быть установлено при микроскопическом и/или культуральном исследовании. Однако необходимо иметь в виду, что микроскопическое исследование не позволяет дифференцировать микобактерии комплекса *Mycobacterium tuberculosis* (возбудителей туберкулеза) от нетуберкулезных («атипичных») микобактерий - возбудителей микобактериозов.

*На основании микроскопического исследования возможно сделать заключение только о наличии или отсутствии в препарате кислотоустойчивых микобактерий*

Это объясняется тем, что в природе существует большое число нетуберкулезных кислотоустойчивых микобактерий, вызывающих микобактериозы, а также кислотоустойчивых сапрофитов, не вызывающих заболевания человека. Микроскопически они неотличимы от *Mycobacterium tuberculosis*.

Несмотря на указанные недостатки, бактериоскопия остается одним из основных методов микробиологических исследований. Ее преимущество заключается в скорости получения результата и относительной простоте исследования. Метод позволяет в короткие сроки (от одного часа) обнаружить наиболее эпидемически опасных больных туберкулезом и микобактериозами, выделяющих большие количества микобактерий, и остается актуальным микробиологическим методом при выявлении больных туберкулезом и микобактериозами на первичных этапах обследования больных, а также при динамическом наблюдении за состоянием микобактериальной популяции в процессе лечения. Кроме того, микроскопическое подтверждение тинкториальных свойств культуры остается обязательным исследованием при ее диагностике.

#### 3.1. Подготовка материала для микроскопического исследования на кислотоустойчивые микобактерии

Чтобы обнаружить микобактерии туберкулеза методами микроскопии, в 1 мл исследуемого материала должно содержаться не менее 10 000 микробных клеток. В мокроте больных с туберкулезом органов дыхания (особенно при наличии у них полостей распада легочной ткани) обычно содержится значительное количество кислотоустойчивых бактерий, что позволяет выявить их при микроскопическом исследовании. Однако бактериовыделение не является регулярным процессом, и это требует определенной тактики сбора материала. Чувствительность этого метода можно повысить, если ввести кратность обследования пациента. Установлено, что при последовательных исследованиях результативность микроскопической диагностики туберкулеза органов дыхания повышается следующим образом: при однократном исследовании — 80-83 %, двукратном — на 10-14 % больше и при исследовании трех проб мокроты — еще на 5-8 % больше. Таким образом, при подозрении на туберкулез органов дыхания рекомендуется исследовать не менее трех проб мокроты.

*Отрицательный результат микроскопического исследования не исключает диагноз туберкулеза, так как в мокроте пациента может содержаться меньше микобактерий, чем может выявить микроскопическое исследование*

Эффективность бактериоскопии существенно возрастает, если контролируется качество собираемого материала. Нарушение

технологий подготовки мазков может быть причиной отрицательного результата микроскопического исследования.

### 3.2. Приготовление мазков для микроскопических исследований

По способу подготовки материала методы микроскопического исследования условно делят на два вида:

— метод прямой микроскопии, когда мазок приготавливается непосредственно из нативного необработанного диагностического материала или осадка (при исследовании жидкого материала);

— метод микроскопии мазка из осадка материала, подготовленного для культурального исследования путем обработки гомогенизирующими и обеззараживающими средствами и последующего центрифугирования.

При соблюдении условий методик, второй метод более информативен примерно на 20-30%, чем прямая микроскопия, так как при подготовке осадка происходит освобождения микробов из окружающей их слизи и обогащение диагностической квоты материала при центрифугировании.

В тех случаях, когда мазок подвергается окраске флюорохромными красителями и исследуется в люминесцентном микроскопе, необходимо иметь в виду, что качественная и эффективная окраска флюорохромными красителями требует обязательного соблюдения кислотности ( $pH$ ) мазка, а также освобождения микобактерий от окружающей их слизи, которая препятствует проникновению красителя в микробную клетку. Несоблюдение этих условий приводит к снижению эффективности люминесцентной микроскопии.

*При культуральном исследовании мазок и посев производятся обязательно из одной и той же порции материала. Это основное требование правильного микробиологического исследования.*

#### 3.2.1. Оборудование и реактивы для приготовления диагностических мазков

Перед началом работы оборудование, реактивы и материалы необходимо разместить так, чтобы было удобно работать и в дальнейшем стараться соблюдать этот привычный порядок.

Все манипуляции по приготовлению мазков из диагностического материала должны быть стандартизованными, а для максимальной безопасности все материалы и реагенты всегда должны находиться на одних и тех же постоянных местах и располагаться в одном и том же порядке.

Для приготовления мазков необходимы:

- Флаконы с поступившим в лабораторию исследуемым материалом;

- Деревянные палочки (аппликаторы) или бактериологические петли диаметром 3 мм для забора сгустков мокроты и распределения их на стекле;

- Одноразовые предметные стекла (обезжиренные, без царапин и сколов) ГОСТ 9284-75;

- Несмываемый при окраске маркировочный карандаш для нанесения идентификационного номера на стекло (алмазный карандаш);

- Пинцет или щипцы для взятия предметных стекол с мазками;

- Емкость (колба, эксикатор, стеклянная банка и т.д.) с отмытым речным песком, залитым техническим спиртом (70°), для очистки бактериологической петли от остатков материала перед очередной стерилизацией ее в пламени горелки;

- Спиртовка или газовая горелка Бунзена для прокаливания петли;

- Одноразовые или стерильные стеклянные чашки Петри для отбора гнойных комочков материала;

- Стерильные мерные пипетки на 10 мл и 5 мл для переноса мокроты в чашки Петри;

- Лотки (подносы), выстланные фильтровальной бумагой, для просушивания приготовленных мазков;

- Контейнеры для сбора и последующего автоклавирования инфицированного материала и загрязненной посуды;

- Емкость с дезинфицирующим раствором для обработки поверхности стола или других объектов по окончании работы и при случайном попадании на них диагностического материала;

- Ватные шарики для обработки загрязненных поверхностей дезинфицирующим раствором.

#### 3.2.2. Подготовка предметных стекол

Процедура приготовления мазков начинается с подготовки предметных стекол. Необходимо использовать только новые, отмытые и обезжиренные в спирте или смеси Никифорова (96° этиловый спирт + диэтиловый эфир в соотношении 1:1) стекла без царапин и сколов. Стекла должны соответствовать ГОСТу. Не рекомендуется использовать саморезанные стекла, которые приводят к значительным абберациям исследуемого изображения или обуславливают образование артефактов. При повторном использовании стекла могут быть недостаточно хорошо отмыты от предыдущего материала, что может привести к получению ложноположительных результатов.

*Стекла, на которых при микроскопическом исследовании были обнаружены кислотоустойчивые микобактерии, сохраняются в лаборатории в течении 1 года, а затем подлежат обязательному уничтожению и не должны использоваться повторно.*

Новые предметные стекла кипятят в 1% растворе питьевой соды (10 г двууглекислого натрия на 1 л воды), промывают в 1% растворе соляной кислоты (к 1 л воды добавляют 10 мл концентрированной соляной кислоты), а затем в проточной воде. Протирают насухо. Для обезжиривания вымытые и высушенные стекла помещают в герметически закрытые емкости со смесью Никифорова или с 96° этиловым спиртом. Стекла должны подвергаться обезжириванию не менее суток. Непосредственно перед приготовлением мазков стекла повторно протираются насухо.

### 3.2.3. *Приготовление мазков из нативного материала и необработанного осадка жидких материалов*

Если мазок будет окрашиваться по методу *Ziehl - Neelsen* и исследоваться в световом микроскопе, *pH* мазка не корректируется.

В случае окраски флюорохромными красителями для исследования в люминесцентном микроскопе перед нанесением материала на предметное стекло необходимо добиться нейтрального значения *pH* (6,8 - 7,0). Уровень *pH* осадка определяют с помощью бумажной индикаторной полоски.

Перед приготовлением мазка на один конец стекла (или его матовую часть) наносят полный номер пробы исследуемого материала, под которым он зарегистрирован в лабораторном регистрационном журнале при приеме материала. Номер наносят с помощью алмазного карандаша или несмываемого маркера с таким расчетом, чтобы в процессе окраски этот номер сохранился.

*Не следует касаться чистой поверхности стекла руками или перчатками!*

Приготовление мазков для прямой микроскопии из нативной мокроты.

Если материал поступил в емкости, в которой невозможно обнаружить и выбрать частицы для приготовления мазка, его переносят в чашку Петри, под дно которой подложена черная бумага. При этом проявляют известную осторожность, чтобы избежать образования аэрозолей.

Так как в необработанной нативной мокроте микобактерии наиболее часто располагаются в плотных комочках распада тканей, следует иметь в виду, что результат микроскопического исследования в значительной степени зависит от правильности выбора этих гнойных комочков.

При приготовлении мазков наиболее удобно пользоваться деревянной палочкой, которую перед работой разламывают пополам. Затем из разных участков образца мокроты выбирают 2 - 3 наиболее плотных гнойных небольших комочка, переносят их на стекло, при необходимости разминают и равномерно распределяют тонким слоем в центре стекла на поверхности приблизительно размером 1 x 2 см в виде овала. Забор комочков производят с помощью сломанных концов палочки, что обеспечивает более надежную фиксацию материала к

палочке и облегчает последующее его нанесение на поверхность предметного стекла и приготовление мазка посредством растирания. На одно предметное стекло следует наносить только один мазок.

Используемые для приготовления мазка палочки удаляют в банку с дезинфицирующим раствором или в контейнер с отработанным заразным материалом. Для каждой порции мокроты используется новая чистая палочка!

Практикуется также приготовление мазков с помощью бактериологических петель или препаровальных игл. Удобно пользоваться двумя петлями или иглами. В случае, когда мазок готовят с помощью бактериологической петли, она может быть использована повторно после очистки от остатков мокроты путем 2-3х кратного погружения ее в банку с песком, залитым спиртом, и последующего прожигания в пламени горелки до появления красного цвета. После прокалывания петлю следует охладить, оставив ее на 1 - 2 минуты в штативе-петледержателе.

Песок для очистки петель может использоваться длительное время при условии периодического обновления раствора спирта с таким расчетом, чтобы его уровень превышал уровень песка не менее чем на 3 см.

Приготовление мазка из осадка необработанного нативного материала.

Такие мазки приготавливают из полученного после центрифугирования осадка любого жидкого диагностического материала (бронхоальвеолярные смывы, промывные воды бронхов или желудка, моча, пунктаты из закрытых полостей, экссудаты). Осадок представляет собой обогащенную фракцию диагностического материала и значительно чаще позволяет получить положительные результаты. Особенностью существования *M. tuberculosis* в жидкостях является способность их долгое время находиться во взвешенном состоянии. В связи с этим рекомендуется производить центрифугирование при 3000 g (см. раздел по культуральным исследованиям данной Инструкции).

Для приготовления мазка, надосадочную жидкость аккуратно удаляют, полученный в пробирке осадок перемешивают и с помощью пипетки наносят на стекло 1-2 капли осадка, распределяя его тонким слоем в центре стекла на площади не менее 1 см x 2 см.

Необходимо иметь в виду, что мазки из осадка жидких материалов (моча, промывные воды бронхов, экссудаты и пр.) легко смываются в процессе окраски. Поэтому мазки из осадка жидких материалов желательно приготавливать на стеклах, предварительно обработанных яичным белком.

Для этого белок куриного яйца в течение 30 – 40 минут взбивают с чистыми стерильными стеклянными бусами в стерильной посуде и оставляют на 1 – 1,5 часа при комнатной температуре. Затем жидкую часть взбитой смеси отбирают пипеткой, переносят ее в другую посуду и, смачивая в ней ватный тампон, аккуратно наносят ее на чистые обезжиренные предметные стекла, равномерно распределяя по 2/3 их

поверхности. 1/3 предметного стекла оставляется необработанной белком для последующего нанесения на нее номера пробы. Обработанные белком стекла раскладывают на чистой фильтровальной бумаге и высушивают при комнатной температуре.

Другим способом закрепления осадка жидкого материала является использование сыворотки крови. На чистом стекле каплю сыворотки смешивают с 1-2 каплями осадка материала и распределяют смесь по стеклу.

#### *3.2.4. Приготовление мазков из осадка диагностического материала, подготовленного для культурального исследования*

Культуральное исследование любого диагностического материала обязательно включает параллельное микроскопическое исследование **осадка** этого материала, полученного после обработки детергентами с последующим отмыванием либо нейтрализацией и центрифугированием.

*Все мазки из осадка приготавливают после выполнения процедуры посева !*

При этом чаще всего используется та же пипетка, которой производился посев. С помощью этой пипетки на стекло наносят 1-2 капли осадка, который распределяют тонким слоем в центре стекла на площади 1 см x 2 см.

Процедура приготовления мазка из осадка обработанного материала:

1. Оставшийся после посева осадок встряхивают, забирают в пипетку.

2. 1-2 капли осадка наносят на предметное стекло, формируя мазок размером ~ 1 x 2 см.

3. Мазок из осадка жидких материалов (моча, промывные воды и др.) во избежание смывания материала при окраске желательно приготавливать на стеклах, предварительно обработанных яичным белком.

При приготовлении мазка для микроскопического исследования необходимо добиваться правильной его толщины. Если мазок слишком тонкий и содержит мало материала, при микроскопическом исследовании можно получить ложноотрицательный результат.

Если мазок слишком толстый, это затрудняет его фиксацию, материал недостаточно плотно прикрепляется к стеклу и может быть частично или полностью удален при окраске. Кроме того, толстый мазок плохо просматривается при микроскопическом исследовании.

Не рекомендуется готовить мазки способом «растяжки» материала между двух предметных стекол. Такой способ сопровождается образованием биологически опасного аэрозоля.

*Через правильно приготовленный мазок можно читать газетный шрифт, расположенный позади стекла на расстоянии 5 – 10 см.*

Ограниченная площадь мазка (~ 1 см x 2 см в центре стекла) значительно повышает безопасность манипуляции и последующей микроскопии, так как периферические части и ребра предметного стекла остаются незагрязненными инфекционным материалом.

#### *3.2.5. Фиксация мазков*

Приготовленные вышеуказанным способом мазки помещают на 15–30 минут на лотки (подносы), выстланные фильтровальной бумагой, и высушивают при комнатной температуре в вытяжном шкафу или при отсутствии такового - на столе, в специально отведенном месте.

*Ни в коем случае не допускается фиксация сырых мазков над пламенем горелки !*

При окраске по *Ziehl-Neelsen* стекла с высохшими мазками пинцетом или специальными щипцами берут за конец, на который нанесена маркировка, и трижды медленно проводят через верхнюю треть пламени спиртовки или газовой горелки до исчезновения признаков запотевания стекла. Общая продолжительность пребывания мазка в пламени не должна превышать 3 – 5 секунд. Затем стекла помещают на специальную подставку («рельсы») для окрашивания.

При окраске мазков флюорохромными красителями рекомендуется фиксация в сухожаровом шкафу при 85°C в течение 45 минут. Однако при отсутствии такой возможности допускается фиксация над пламенем горелки.

В плане охраны труда оптимальным является метод, предложенный *A. Hain*. Этот метод фиксации мазков используется как при окраске по *Ziehl-Neelsen*, так и люминесцентными красителями. Согласно этому методу, предметные стекла с мазками раскладывают на жестяные или эмалированные подносы и помещают в сушильный шкаф, где сначала высушивают при 37°C. Затем температуру повышают до 105°C и, спустя 10 минут, шкаф выключают. При таком методе достигается надежное прикрепление материала к стеклу и гибель микобактерий, как находящихся в материале мазка, так и случайно попавших на поднос. Фиксирующая температура не должна превышать 105°C, чтобы не изменить тинкториальные свойства микобактерий.

Высушенные и фиксированные мазки должны сразу же окрашиваться. Нефиксированные мазки ни в коем случае не должны оставаться открытыми на ночь, так как это увеличивает опасность распространения.

Фильтровальная бумага, которой был выстлан лоток (поднос), по окончании фиксации каждой серии мазков подлежит обязательному сжиганию или автоклавированию, а лоток обжигается спиртом. Лотки ежедневно выстилаются чистой бумагой.

### 3.3. Методы окраски диагностических мазков

Для окраски мазков, приготовленных непосредственно из диагностического материала (метод прямой микроскопии) и из осадка обработанного для культурального исследования, используются методы, позволяющие выявлять кислотоустойчивые микроорганизмы:

- окраска по методу *Ziehl-Neelsen* для исследования в световом микроскопе;
- окраска флюорохромными красителями для исследования в люминесцентном микроскопе.

Люминесцентную микроскопию рекомендуется использовать при большом количестве исследуемых ежедневно мазков (более 30 мазков в день).

#### 3.3.1. Окраска препаратов для световой микроскопии по методу *Ziehl-Neelsen*

Метод окраски по *Ziehl-Neelsen* является наиболее распространенным методом для выявления кислотоустойчивых микобактерий. Он основан на использовании нескольких специальных методических приемов:

- *окраска фуксином (с подогреванием)* — при одновременном воздействии нагревания и сильного протравливающего действия карболовой кислоты повышается способность красителя проникать в микробную клетку и особенно в структуры ее клеточной стенки, состоящей из липидов, миколовых кислот и восков. Обычные анилиновые красители не проникают в клеточную стенку микобактерий, и последние не окрашиваются;

- *обесцвечивание (3 мин.)* — последующая обработка мазка 25% раствором серной кислоты или 3% раствором солянокислого спирта приводит к обесцвечиванию красителя, проникшего в структуры, не обладающие достаточной гидрофобностью и стойкостью к разрушению в кислоте (*кислотоустойчивостью*). Только кислото- и спиртоустойчивые микроорганизмы стойко удерживают краситель и остаются после обесцвечивания окрашенными в малиново-красный цвет;

- *контрастирующая окраска (1 мин.)* — обесцвеченные элементы мазка докрашивают метиленовым синим для придания контрастности препарату.

##### 3.3.1.1. Оборудование и реактивы для окраски по методу *Ziehl-Neelsen*

Для окраски мазков по методу *Ziehl - Neelsen* необходимы:

— Раковина или специальный вместительный лоток для проведения окраски;

— Специальный штатив («рельсы») для окраски мазков на предметных стеклах;

— Пинцет или щипцы для взятия предметных стекол с мазками;

— Газовая или спиртовая горелка для фиксации препарата (если мазки не фиксированы в сушильном шкафу) и подогревания его при окрашивании карболовым фуксином; или

— Металлический стержень с ватным тампоном, который используется вместо горелки для подогревания препарата при окрашивании карболовым фуксином;

— Фильтровальная бумага размером ~ 4 x 1,5 см для окраски мазков карболовым фуксином;

— Раствор карболового фуксина;

— 25% раствор серной кислоты или

— 3% раствор солянокислого спирта;

— Дистиллированная вода для промывания мазков;

— 0,3% раствор хлорида метиленового синего;

— Штатив для просушивания окрашенных стекол на воздухе в вертикальном или наклонном положении.

#### **Реактивы:**

- Спирт этиловый 96° марки ОП-2, ТУ 6-09-4512-77;
- Кислота соляная концентрированная, ГОСТ 3118-77;
- Кислота серная концентрированная, ГОСТ 4204-77;
- Фенол кристаллический, ГОСТ 6417-72;
- Фуксин основной, ТУ 6-09-3804-82;
- Метиленовый синий хлорид, ТУ 6-09-945-75;
- Глицерин, ЧДА, ГОСТ 6259-75;
- Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72;

#### 3.3.3. Приготовление растворов:

**Раствор 1.** Насыщенный спиртовой раствор фуксина:

— растереть в ступке 0,3 г основного фуксина с 2-3 каплями глицерина, добавить по каплям 10 мл 96° этилового спирта.

**Раствор 2.** Рабочий раствор фенола (5% водный раствор):

— расплавить 5 г кристаллического фенола путем легкого подогревания на водяной бане (температура плавления фенола – 41°С). Добавить слегка подогретую дистиллированную воду до объема 100 мл.

**Раствор 3.** Рабочий раствор карболового фуксина:

— в 90 мл раствора 2 добавить 10 мл раствора 1.

**Раствор 4.** Обесцвечивающие растворы:

а) Раствор серной кислоты

К 75 мл дистиллированной воды осторожно долить 25 мл концентрированной серной кислоты, постепенно насаивая ее по стенкам сосуда. Смешать. Содержимое нагреется.

*Никогда не добавляйте воду в кислоту !*

б) Раствор солянокислого спирта

Вместо раствора серной кислоты для обесцвечивания можно использовать 3% солянокислый спирт:

Этиловый спирт 96°	97 мл
Концентрированная соляная кислота	3 мл

К 97 мл спирта *осторожно* добавить 3 мл концентрированной соляной кислоты.

*Всегда осторожно вливайте кислоту в спирт, но не наоборот !*

**Раствор 5.** Рабочий раствор метиленового синего:

— растворить 0,3 г хлорида метиленового синего в 100 мл дистиллированной воды.

**Хранение растворов.** Все приготовленные растворы должны быть профильтрованы через бумажный фильтр и помещены в герметически закрытые емкости из темного стекла. На каждой емкости должна быть надпись с названием содержащегося в ней раствора, датой его приготовления, сроком годности и указанием фамилии специалиста, готовившего раствор. Растворы хранят при комнатной температуре, в темном месте.

Рабочий раствор карболового фуксина может храниться не более 2-х недель, так как после этого срока фуксин начинает выпадать в осадок, что изменяет заданные свойства раствора.

Другие рабочие растворы значительно более стойки при хранении. Однако рекомендуется готовить их одновременно с раствором карболового фуксина, т.е. через каждые 2 недели. Это позволит быть уверенным в качестве используемых красителей.

### 3.3.1.2. Процедура окраски

— убедитесь, что подготовленные мазки фиксированы и промаркированы;

— препараты помещают на подставку («рельсы») так, чтобы они не касались друг друга, и расстояние между ними составляло порядка 1 см, а маркировка (номер) была направлена в одну сторону. Максимально на стандартные «рельсы» помещают не более 12 стекол;

— на каждое стекло накладывают полоску фильтровальной бумаги так, чтобы она полностью закрывала мазок. Это делают для того, чтобы краска не разливалась по стеклу. Одновременно за счет использования фильтровальной бумаги предотвращается осаждение на мазок кристаллов краски, которые при микроскопическом исследовании могут быть ошибочно приняты за кислотоустойчивые микобактерии;

— наливают на бумагу раствор карболового фуксина с избытком и нагревают препарат над пламенем горелки до легкого появления паров. При подогревании препарата следят за тем, чтобы краска не закипела, а фильтровальная бумага не высыхала. Подогретый мазок оставляют на 5 минут, чтобы краситель проник в клеточную стенку микобактерий и окрасил ее;

— пинцетом снимают и удаляют фильтровальную бумагу;

— осторожно (!) смывают остатки краски слабой струей дистиллированной воды до тех пор, пока не прекратится видимое отхождение краски. При промывании мазков следует использовать холодную воду или воду комнатной температуры.

— перед тем, как нанести на стекло следующий раствор, щипцами или пинцетом берут каждое стекло за маркированный конец и наклоняют, чтобы с него стекла вода; это предотвращает разбавление следующего реактива;

— мазок обесцвечивают 3 минуты одним из обесцвечивающих растворов, полностью покрывая всю поверхность мазка;

— мазок тщательно промывают дистиллированной водой и докрашивают в течение до 1 минуты (не превышать экспозицию!) 0,3% раствором метиленового синего;

— вновь аккуратно промывают проточной водой, наклоняя каждое стекло, чтобы стекала вода;

— высушивают на открытом воздухе при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.

*Не следует промокать препарат !*

В результате микобактерии туберкулеза окрашиваются в малиново-красный цвет, а другие микроорганизмы и клеточные элементы — в голубой.

При использовании 0,3% раствора метиленового синего для окраски фона препарата (контрастирующая окраска) следует иметь в виду, что при толстом мазке или превышении времени окраски этот краситель может как бы «скрыть» кислотоустойчивые микобактерии.

Если в процессе окраски произошло загрязнение краской нижней свободной от мазка поверхности предметного стекла, перед микроскопией следует аккуратно протереть ее тампоном, смоченным солянокислым спиртом.

Препарат исследуют с масляной иммерсией в световом микроскопе.

### 3.3.2. Окраска препаратов для люминесцентной микроскопии

Метод основан на наблюдении микроскопических объектов с использованием их способности к свечению. По сравнению с методами обычной микроскопии исследование в свете люминесценции обладает рядом преимуществ: цветное свечение, высокая степень контрастности светящихся объектов на темном фоне, значительно большая площадь поля зрения.

Суть люминесцентной микроскопии заключается в том, что объекты (бактериальные клетки), окрашенные специальными красителями (флюорохромами), под действием облучения их ультрафиолетом испускают излучение в видимом спектре света. В случае, когда объект не окрашен специальными красителями, ультрафиолетовый свет, проходя через объектив и попадая на

препарат, поглощается молекулярными структурами объекта и остается невидимым или почти невидимым для человеческого глаза. Если же какие-либо объекты окрашены специальным красителем, то молекулы красителя под действием ультрафиолета возбуждаются и начинают испускать кванты света в длинноволновой области, иначе говоря — светиться. В этом случае клетка становится источником света определенного спектра и хорошо видна на общем темном контрастном фоне препарата.

Источник света должен содержать в своем спектре длину волны, возбуждающую молекулы красителя, а светофильтры подбираются таким образом, чтобы добиться хорошего расхождения между длинами волн возбуждающего ультрафиолетового света и излучения, испускаемого возбужденными объектами.

При люминесцентной микроскопии используют специальный микроскоп. Источником света в нем служит кварц-галогеновая или ртутная лампа. Для красителей системы аурамин/родамин используют подборку из следующих фильтров (на примере микроскопа РПО8 ЛОМО):

- возбуждающий фильтр ФС 1-4,
- запирающий фильтр СЗС 21-2 и
- нейтральный фильтр БС 8-3.

*Светофильтры возбуждения* служат для выделения из потока излучения источника света тех лучей, которые обеспечивают возбуждение и свечение объекта; эти фильтры устанавливаются в ветви осветителя.

*Запирающий светофильтр* служит для ограничения (срезания) света возбуждения и пропускания только света люминесценции; этот фильтр устанавливается в наблюдательной ветви.

*Наблюдательные (сменные) фильтры* имеют разное назначение: фильтры для защиты глаз от попадания красных и инфракрасных лучей; теплозащитные фильтры и др. В отечественных микроскопах применяются фильтры из стекла БС8 для предохранения объектов микроскопии от выцветания.

Люминесцентные красители (аурамин ОО, родамин С и др.) связываются с воскоподобными структурами микробной клетки. При облучении окрашенных клеток возбуждающим светом они начинают светиться оранжевым или ярко-желтым светом на черном или темно-зеленом фоне.

За счет свечения вокруг клетки образуется ореол, благодаря которому видимые размеры светящейся клетки превышают ее физические размеры. В связи с этим окрашенные флюорохромными красителями препараты обычно исследуются при увеличении  $250\times$  –  $450\times$ , тогда как окрашенные фуксином – при увеличении  $800\times$  –  $1000\times$ . Разница в увеличении позволяет микроскописту видеть одновременно в 4—10 раз большее поле зрения, что существенно сокращает время, необходимое для просмотра мазка. Подсчитано, что если микроскопическое исследование необходимой площади мазка при окраске по *Ziehl-Neelsen* продолжается приблизительно 10 минут, то

для исследования той же площади мазка методом люминесцентной микроскопии потребуется только 2—3 минуты.

Наряду с этим при люминесцентной микроскопии отмечается значительно большая резкость и контрастность микроскопической картины, что повышает комфортность микроскопического исследования. Для глаза исследователя значительно легче обнаружить флюоресцирующие оранжевые или ярко желтые микобактерии на темном (при гашении фона метиленовым синим или перманганатом калия) или темно красном (при гашении фона акридиновым оранжевым) фоне, чем выявить красные микобактерии на голубом фоне клеточного детрита при окраске по *Ziehl-Neelsen*. Это делает метод люминесцентной микроскопии особенно ценным при исследовании олигобациллярного материала.

Указанные преимущества наиболее выражены при использовании люминесцентной микроскопии в лабораториях, выполняющих ежедневно большое число исследований (порядка 30 и более).

Мазки для люминесцентной микроскопии предпочтительно готовить из осадка после обработки материала детергентом с последующим отмыванием и центрифугированием. Перед нанесением материала осадка на предметное стекло необходимо добиться нейтрального значения *pH* (6,8-7,0). С этой целью осадок нейтрализуют несколькими каплями 6% раствора соляной кислоты или 6% едкого натра (в зависимости от метода обработки материала), тщательно встряхивают и с помощью бумажной индикаторной полоски определяют уровень *pH* (оптимально 6,8) осадка.

Во всех сомнительных случаях микроскопической картины для контроля следует использовать микроскопию мазка, повторно окрашенного по методу *Ziehl-Neelsen*.

### 3.3.2.1. Оборудование и реактивы для окраски флюорохромными красителями

- Раковина или специальный вместительный лоток для проведения окраски;
- Специальный штатив («рельсы») для окраски мазков на предметных стеклах;
- Пинцет или щипцы для взятия предметных стекол с мазками;
- Газовая или спиртовая горелка для фиксации препарата, если он не фиксирован ранее в сушильном шкафу; или металлический стержень с ватным тампоном, используемого вместо горелки для фиксации препарата, если он не фиксирован ранее в сушильном шкафу;
- Раствор флюоресцентных красителей;
- Раствор для обесцвечивания мазков;
- Раствор для гашения фона обесцвеченного мазка;
- Емкость с дистиллированной водой для промывания мазков;
- Штатив для просушивания окрашенных стекол на воздухе в вертикальном или наклонном положении.

*При окраске флюорохромными красителями ни в коем случае нельзя подогреть мазки и пользоваться накладками из фильтровальной бумаги!*

Промывание мазков в процессе окраски следует производить только дистиллированной водой, так как водопроводная вода содержит соединения хлора, которые могут изменять флюоресценцию.

В случае невозможности проведения немедленной микроскопии окрашенные мазки рекомендуется сохранять, прикрыв черной бумагой во избежание ослабления флюоресценции.

При окраске мазков необходимо:

— избегать неполного обесцвечивания;

— не делать толстых мазков, так как это затрудняет обесцвечивание и фиксацию мазка на стекле.

Мазки, которые использовались для флюоресцентной микроскопии, в случае сомнений в истинности феномена кислотоустойчивости можно повторно окрасить по методу *Ziehl-Neelsen*.

В нашей стране наибольшее распространение получили следующие методы окраски микобактерий люминесцентными красителями:

### 3.3.2.2. Метод окраски аурамином ОО и родамином С

#### **Реактивы:**

- Спирт этиловый 96° марки ОП-2, ТУ 6-09-4512-77;
- Кислота соляная концентрированная, ГОСТ 3118-77;
- Метиленовый синий хлорид, ТУ 6-09-945-75;
- Аурамин ОО, (аурамин О – *Sigma*);
- Родамин С, ТУ-6 –09-2463-77 (родамин В – *Sigma*);
- Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72.

#### **Приготовление растворов:**

**Раствор 1.** Раствор аурамина - родамина:

Аурамин ОО	1,0 г
Родамин С	0,1 г
Вода дистиллированная	1000 мл

Каждый краситель растворяют отдельно в 150 – 200 мл дистиллированной воды и помещают в термостат при 37°С на 18 – 24 часа. Затем растворы сливают в одну емкость и доводят общий объем до 1000 мл.

Приготовленный раствор красителей хранят в емкости из темного стекла в прохладном, защищенном от света месте.

*Аурамин обладает канцерогенной активностью, поэтому не следует допускать попадания на кожу его порошка или раствора.*

**Раствор 2.** Обесцвечивающий раствор:

Концентрированная соляная кислота	3 мл
Этиловый спирт 96°	97 мл
Аккуратно добавить 3 мл концентрированной соляной кислоты к 97 мл этилового спирта.	

**Всегда осторожно вливайте кислоту в спирт, но не наоборот !**

**Раствор 3.** Гаситель фона:

Метиленовый синий хлорид	25 мг
Вода дистиллированная	100 мл
В 100 мл дистиллированной воды растворить 25 мг метиленового синего хлорида.	

**Хранение растворов.** Написать на этикетке название раствора, концентрацию, дату приготовления и срок хранения. Растворы желательно хранить в темной посуде при комнатной температуре в течение 3 месяцев. Перед использованием растворов их просматривают для исключения преципитата. Если последний обнаружен, раствор можно профильтровать.

#### **Процедура окраски:**

1. Стекла с **фиксированными мазками** раскладывают на специальные штативы «рельсы» для окраски так, чтобы они не касались друг друга.

2. Мазки заливают *раствором 1* на 1 час.

*Не нагревать мазки и не использовать полоски фильтровальной бумаги !*

3. Тщательно, но аккуратно промывают мазки дистиллированной водой.

4. Обесцвечивают *раствором 2* (солянокислый спирт) в течение 3 мин.

5. Промывают дистиллированной водой.

6. Гашение фона осуществляют *раствором 3* в течение 60 сек. Если препарат имеет интенсивную синюю окраску, можно очень аккуратно повторно промыть его дистиллированной водой.

7. Мазки высушивают при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.

### 3.3.2.3. Метод окраски аурамином О

(Hagemann P. K., 1938; CDC 1985; WHO, 1998)

#### **Реактивы:**

- Спирт этиловый 96° марки ОП-2, ТУ 6-09-4512-77;
- Кислота соляная концентрированная, ГОСТ 3118-77;
- Фенол кристаллический (карболовая кислота), ГОСТ 6417-72;
- Аурамин О, *Sigma* (2465-27-2);
- Акридиновый оранжевый, С.1.46005; ИЛИ

Перманганат калия, ГОСТ 10163-76;

- Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72;
- Безводный двузамещенный фосфат натрия, ГОСТ 4172-66.

#### **Приготовление растворов:**

**Раствор 1.** Спиртовой раствор аурамина О:

Аурамин	0,1 г
Этиловый спирт	10 мл

Растворить аурамин в спирте.

Аурамин обладает канцерогенной активностью, поэтому не следует допускать попадания на кожу его порошка или раствора.

**Раствор 2.** Раствор фенола:

Фенол кристаллический	3,0 г
Дистиллированная вода	87 мл

Расплавить кристаллы фенола (температура плавления 41°C) и растворить в дистиллированной воде, пользуясь подогреванием на водяной бане. Довести общий объем до 90 мл.

**Раствор аурамина О.** Смешать растворы 1 и 2 и перелить в плотно закрывающуюся емкость из темного стекла, которую необходимо хранить в прохладном затемненном месте. На этикетке обозначить название раствора, дату приготовления и срок годности. Готовый раствор может храниться при комнатной температуре в течение 3 месяцев. В процессе хранения раствор может стать мутным, однако это не влияет на качество окрашивания.

**Раствор 3.** Обесцвечивающий раствор:

Концентрированная соляная кислота	0,5 мл
Технический 70° этиловый спирт	100 мл

Аккуратно добавить концентрированную соляную кислоту к спирту.

*Всегда осторожно вливайте кислоту в спирт, но не наоборот!*

Напишите на этикетке название раствора, его концентрацию, дату приготовления и срок хранения. Раствор можно хранить в темной посуде при комнатной температуре в течение 3 месяцев.

**Растворы 4.** Гасители фона:

Для дополнительного окрашивания препаратов можно использовать растворы перманганата калия или акридинового оранжевого.

**а) Раствор перманганата калия:**

Перманганат калия ( $KMnO_4$ )	0,5 г
Дистиллированная вода	100 мл

Растворить перманганат калия в дистиллированной воде и перелить в плотно закрывающуюся бутылку из темного стекла. На этикетке обозначить название раствора, концентрацию, дату приготовления и срок годности.

Готовый раствор может храниться при комнатной температуре в течение 3 месяцев.

**б) Раствор акридинового оранжевого:**

Безводный двузамещенный фосфат натрия ( $Na_2HPO_4$ )	0,01 г
Дистиллированная вода	100 мл
Акридиновый оранжевый	0,01 г

Растворить фосфат натрия в дистиллированной воде. Добавить акридиновый оранжевый.

**Хранение реактивов.** Хранят приготовленные растворы в плотно закрывающейся темной емкости. На этикетке обозначают название раствора, дату приготовления и срок годности. Готовый раствор может храниться при комнатной температуре в темном месте в течение 3 месяцев.

#### **Процедура окраски:**

1. Стекла с фиксированными мазками раскладывают на специальные штативы «рельсы» для окраски так, чтобы они не касались друг друга.

2. Мазки заливают раствором аурамина О на 15 минут.

*Не нагревать мазки и не использовать полоски фильтровальной бумаги !*

3. Тщательно, но аккуратно промывают мазки дистиллированной водой.

4. Обесцвечивают *раствором 3* (0,5% раствор солянокислого спирта) в течение 2 минут.

5. Промывают дистиллированной водой каждое стекло до тех пор, пока не смоются остатки краски.

6. Гашение фона осуществляют раствором перманганата калия или акридинового оранжевого в течение 2 минут.

При использовании перманганата калия время его воздействия не должно превышать 2 минуты. Точность экспозиции имеет решающее значение, так как при передержке интенсивность флюоресценции микобактерий может уменьшаться.

7. Мазки промывают **дистиллированной** водой.

8. Мазки высушивают при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.

#### **3.3.2.4. Хранение приготовленных мазков**

Приготовленные мазки хранят в защищенном от света месте при комнатной температуре. Используют специальные коробки. Стекла не должны соприкасаться друг с другом для исключения повреждения целостности мазка. Положительные мазки хранят 1 год и более, если большой находится это время в стационаре. Окрашенные флюоресцентными красителями мазки чувствительны к дневному и ультрафиолетовому свету. Во время процесса микроскопирования они способны обесцветиться за несколько секунд. Для исключения этого мазки просматривают достаточно быстро, а при необходимости сделать паузу, перекрывают поток света от лампы шторкой.

Обесцвечившиеся мазки можно повторно окрасить, однако это не всегда приводит к полному восстановлению препарата.

### 3.4. Техника микроскопического исследования препарата

#### 3.4.1. Оборудование и реактивы для проведения микроскопического исследования препаратов, окрашенных по методу Ziehl – Neelsen

Для проведения микроскопического исследования при окраске по методу *Ziehl-Neelsen* необходимы:

- Бинокулярный микроскоп;
- Иммерсионное масло;
- Капельница для нанесения масла на препарат;
- Штатив с окрашенными и высушенными мазками, которые должны быть расположены в порядке номеров регистрации;
- Емкость с ксилолом, спирто-эфирной смесью или 70°спиртом;
- Фильтровальная бумага для удаления иммерсионного масла с поверхности просмотренного препарата;
- Коробки для хранения просмотренных мазков;
- Мягкая хлопчатобумажная ткань, бумажные салфетки или марлевые тампоны для протирания линз микроскопа;
- Бумага и ручка для записи результатов микроскопического исследования;
- Емкость с дезинфицирующим средством.

Для исследования мазков, окрашенных по *Ziehl-Neelsen*, используют световой бинокулярный микроскоп с иммерсионным объективом 90х или 100х и окулярами 7х или 10х.

#### 3.4.2. Настройка микроскопа для исследования в проходящем свете

Новое поколение отечественных и зарубежных микроскопов оснащено самоцентрирующимися галогенными лампами, и настройка (фокусировка) нити лампы в апертурной диафрагме конденсора производится на заводе-изготовителе. Это существенно облегчает настройку освещения микроскопа по Кёлеру, которая в этих марках микроскопов сводится к ряду приемов, позволяющих совместить оптическую ось изображения и ось подсветки.

- Перед началом работы убедиться, что электрическое напряжение в лаборатории соответствует допустимому при работе с микроскопом. В случае необходимости воспользоваться стабилизатором напряжения.

- Осмотреть, нет ли в микроскопе поврежденных или сломанных деталей.

- Включить освещение микроскопа, отрегулировав его на малое напряжение, которое используется при работе с малым увеличением.

- Проверить правильность регулировки и фокусировку (направленность) источника света.

- Убедиться, что конденсор с открытой диафрагмой занимает *верхнее положение*, а матовое стекло отсутствует в тракте подсветки (под конденсором);

Настройку освещения микроскопов рекомендуется производить следующим образом.

- Установить в ход лучей объектив 40х и сфокусировать его на резкое изображение поверхности препарата.

- Установить препарат таким образом, чтобы в поле зрения микроскопа попал наиболее прозрачный участок.

- Вращая кольцо полевой диафрагмы, расположенное на основании микроскопа, закрыть полевую диафрагму.

- С помощью расположенной на конденсоре специальной рукоятки закрыть апертурную диафрагму.

- Перемещая конденсор путем вращения винта вертикального перемещения конденсора, добиться резкого изображения краев прикрытой полевой диафрагмы в поле зрения микроскопа.

- С помощью фронтально от конденсора расположенных центровочных винтов добиться перемещения изображения краев прикрытой диафрагмы в центр поля зрения.

- Вращая кольцо полевой диафрагмы, раскрыть ее до размеров поля зрения.

- С помощью рукоятки конденсора раскрыть апертурную диафрагму приблизительно на 1/3 хода, добиваясь четкого появления окраски объектов изображения в препарате и достаточной глубины резкости.

- Заменить окуляр в правом окулярном тубусе на точечную диафрагму ( из комплекта микроскопа) или на дополнительный микроскоп МИР-4, который предварительно настроить на изображение. В первом случае будет видна яркая нить накала лампы. Уменьшая силу света, необходимо добиться изображения нити. Она должна иметь сфокусированное изображение. В случае использования дополнительного окуляра при правильно настроенном микроскопе будет наблюдаться следующая картина: темный диск, заполняющий поле зрения, и тонкая полоска света по диаметру выходного зрачка микрообъектива (должно быть перекрыто  $\approx 9/10$  диаметра выходного зрачка).

- Заменить точечную диафрагму или дополнительный микроскоп на рабочий окуляр и приступить к наблюдению препарата в светлом поле. Для большего комфорта можно вставить матовое стекло в тракт прохождения света, добавив света реостатом лампы.

- Этой манипуляцией завершается настройка микроскопа.

*Многие современные микроскопы оснащены центрированными и неподвижными конденсорами, что облегчает процедуру настройки. Регулировка осуществляется только с помощью открытия апертуры ирисовой диафрагмы до 70-80%, что обеспечивает равномерное освещение поля зрения.*

### 3.4.3. Морфологические характеристики кислотоустойчивых микобактерий при окраске по методу Ziehl-Neelsen

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 в нативных препаратах 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».

В препарате могут выявляться также измененные коккоподобные кислотоустойчивые формы возбудителя, округлые сферические или мицелиеподобные структуры. Однако в случае обнаружения измененных форм кислотоустойчивых микроорганизмов положительный ответ должен быть подтвержден дополнительными методами исследования.

Клетки, выращенные на питательной среде, отличаются внешне от видимых в нативном препарате. Как правило, в первом случае микобактерии чуть толще и короче, окраска их ярче. Клетки могут быть агрегированы или сплетаться в колонии с образованием кос или сплетений.

Некоторые другие микроорганизмы, не относящиеся к *M. tuberculosis*, могут иметь различные формы — от длинных палочек до кокковидных форм с различной интенсивностью окрашивания.

Различную степень кислотоустойчивой окраски можно наблюдать не только у микобактерий, но и у других микроорганизмов. Это могут быть *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Legionella*, а также цисты *Cryptosporidium* и *Isospora*.

Быстрорастущие микобактерии могут отличаться по степени кислотоустойчивой окраски - при частичной потере кислотоустойчивой окраски они приобретают фиолетово-малиновый цвет.

### 3.4.4. Оборудование и реактивы для проведения микроскопического исследования препаратов, окрашенных флюорохромными красителями

Для проведения микроскопического исследования при окраске флюорохромами необходимы:

- Люминесцентный микроскоп;
- Штатив с окрашенными и высушенными мазками, которые должны располагаться в порядке номеров регистрации;
- Коробки для хранения просмотренных мазков;
- Мягкая хлопчатобумажная ткань, бумажные салфетки или тампоны для протирания линз микроскопа;
- Бумага и ручка для записи результатов микроскопического исследования.
- Емкость с дезинфицирующим средством.

Для исследования мазков, окрашенных флюорохромными красителями, используют люминесцентный микроскоп с набором объективов и окуляров, позволяющих получить увеличение объекта наблюдения в пределах 250х – 630х. Необходимо использовать объективы, предназначенные для люминесцентной микроскопии.

### 3.4.5. Осветительные системы и настройка люминесцентного микроскопа

Освещение объектов на предметном стекле осуществляется сверху через коллектор, систему светофильтров, светоделительную пластину и объектив микроскопа.

#### Подготовка к работе и настройка освещения (на примере РПО-8 ЛОМО)

1. Присоединить фонарь ртутной лампы к источнику питания.
2. Закрыть шторку микроскопа.
3. Включить источник питания и зажечь лампу, руководствуясь описанием источника питания, изложенным в паспорте микроскопа.

*Нельзя выключать ртутную лампу ранее чем через 15 минут после ее зажигания. Повторное включение ртутной лампы допускается только через 10 минут после ее выключения (после ее полного охлаждения).*

4. Дать прогреться фонарю не менее 10 минут после зажигания ртутной лампы.
5. Установить переключатель, расположенный слева на тубусе микроскопа, в положение СП установить в тубус направляющую с пластиной СП.
6. Установить в гнездо тубуса теплозащитную кювету или теплозащитный светофильтр СЗС 24 в прямоугольной оправе.

7. Установить в гнездо тубуса нейтральный светофильтр НС3-2 в прямоугольной оправе.

8. Установить в правую окулярную трубку бинокулярной насадки точечную диафрагму.

9. Поворотом револьверной головки ввести в ход лучей свободное от объектива отверстие.

10. Открыть шторку (полевую диафрагму), расположенную в осветительной ветви осветителя.

11. Поместить на предметный столик лист белой бумаги.

12. Отцентрировать изображение светящейся дуги лампы относительно свободного отверстия, для чего с помощью центрировочных винтов при лампе переместить изображение нити лампы в центр светящегося круга от отверстия.

13. Прикрыть полевую диафрагму.

14. Добиться резкого изображения дуги на бумаге, для чего с помощью рукоятки переместить коллектор в осветительной части микроскопа вдоль оптической оси.

15. Проверить окончательную центровку электродов лампы, наблюдая изображение электродов и светящейся дуги лампы через точечную диафрагму.

От правильной настройки (центрировки) люминесцентного осветителя зависит интенсивность и равномерность свечения объектов в поле зрения.

*Настройка микроскопа для наблюдения объектов в свете люминесценции*

1. Вставить в пазы корпуса осветителя выбранные для работы возбуждающий (ФС 1-4) и запирающий (СЗС 21-2) светофильтры или направляющую с пластиной.

2. Установить в гнездо светофильтр БС 8-3 вместо светофильтра НС3-2.

3. Вставить окуляры в окулярные трубки бинокулярной насадки.

4. Установить в револьверное устройство полный набор объективов.

5. Ввести в ход лучей выбранный рабочий объектив.

6. Установить на предметном столике микроскопа препарат и закрепить его с помощью препаратоводителя.

7. Открыть полевую диафрагму до размеров поля зрения в окуляре.

8. Раздвинуть окуляры до полного совмещения изображений, видимых правым и левым глазом исследователя.

9. С помощью механизмов грубой и точной фокусировки (макро- и микровинт) добиться оптимальной резкости изображения. Если объект наблюдения недостаточно контрастный, сфокусировать прибор можно, ориентируясь на маркировку, нанесенную на препарат.

10. Проверить равномерность освещения поля зрения, перемещая рукоятку коллектора.

Микроскоп готов к работе.

Для предохранения препаратов от выцветания в перерывах между наблюдениями необходимо закрывать шторку лампы, находящуюся в осветительном тракте ртутной лампы.

#### *3.4.6. Порядок проведения микроскопического исследования*

Современные микроскопы являются сложными техническими устройствами, чувствительными к настройке и правилам эксплуатации. Перед началом работы они должны быть настроены и адаптированы под зрение микроскописта. Это лучше поручить инженерной службе, но можно провести самостоятельно, руководствуясь инструкцией к микроскопу и вышеприведенным описанием. Несоблюдение правил настройки может привести к существенному снижению эффективности микроскопических исследований и даже невозможности их проведения.

Исследование мазков, окрашенных по методу *Ziehl-Neelsen*, производится в проходящем свете с помощью светового микроскопа. Рекомендуется это делать с помощью бинокулярного микроскопа.

При исследовании мазков, окрашенных флюоресцентными красителями, используется люминесцентный микроскоп. При этом одной из важных особенностей работы в этом случае является то, что окрашенные флюорохромными красителями мазки не подлежат длительному хранению при дневном свете или длительному просмотру, так как интенсивность люминесценции окрашенного объекта при этом быстро снижается.

Работу начинают с определения положительных мазков предыдущего дня или просмотра. Это позволит относительно быстро оценить состояние настройки и готовности микроскопа к работе.

Перед началом микроскопического исследования в световом микроскопе необходимо:

- проверить наличие на столе для микроскопии необходимого для проведения микроскопического исследования оборудования и дополнительных материалов;
- снять чехол, которым накрыт микроскоп;
- осмотреть микроскоп и протереть сухой салфеткой механические части микроскопа;
- убедиться в целостности оптической системы;
- включить осветительную систему и убедиться в достаточности освещения, ее настройки;
- с помощью бумажной салфетки или ватного тампона, смоченного спирто-эфирной смесью, протереть линзы микроскопа;
- убедиться в том, что подготовленные для микроскопии окрашенные препараты достаточно хорошо высушены;
- вращая винт грубой фокусировки (макрвинт), опустить предметный столик, максимально отдалив его от объектива;
- поворотом револьверного устройства установить объектив с малым увеличением (10х) точно над конденсором;

- поместить на столик предметное стекло таким образом, чтобы мазок находился прямо под объективом; при этом обязательно убедиться, что мазок находится в верхней плоскости предметного стекла, а не снизу;

- закрепить препарат на столике с помощью клемм препаратоводителя;

- с помощью винтов препаратоводителя выбрать участок мазка для просмотра;

- раздвинуть окуляры до полного совмещения изображений, видимых правым и левым глазом исследователя;

- глядя сбоку, внимательно контролировать расстояние между стеклом и линзой объектива. Медленно вращая винт грубой фокусировки (макровинт), поднять предметный столик с препаратом к объективу, но не допускать соприкосновения предметного стекла с линзой объектива.

- глядя через окуляр, отрегулировать интенсивность светового потока так, чтобы свет был ярким, но комфортным. Для этого лучше всего использовать регулятор накала лампы, использовать темные или матовые фильтры и в крайнем случае изменить степень открытия диафрагмы.

Положение конденсора изменять не рекомендуется!

- продолжая смотреть через окуляр, медленно повернуть макровинт, чтобы предметный столик отошел от линзы объектива. Обычно достаточно нескольких поворотов винта;

- затем, глядя в окуляр, медленно вращать макровинт до тех пор, пока не появится изображение мазка. Небольшими поворотами макровинта настроить изображение до получения достаточной резкости.

*Никогда не поднимайте столик микроскопа, глядя в окуляр.*

*Это может привести к соприкосновению фронтальной линзы объектива с предметным стеклом, повреждению линзы или к порче препарата.*

- глядя правым глазом в правый окуляр, сфокусировать изображение;

- глядя левым глазом в левый объектив, сфокусировать изображение путем поворота дополнительного фокусировочного кольца, расположенного на левом окуляре.

### 3.4.7. Исследование объекта с большим увеличением с помощью «сухой» оптической системы

Порядок работы

- После работы с препаратом под малым или средним увеличением, не меняя фокусировки, выбрать объектив с более сильным увеличением.

- Убедиться, что этот объектив не касается предметного стекла, и поворотом revolverного устройства поместить выбранный объектив непосредственно над препаратом. При этом мазок должен оставаться почти в фокусе объектива.

- С помощью макровинта сфокусировать резкость изображения. Правильная настройка света также может улучшить качество изображения.

Все манипуляции по настройке проводятся при сфокусированном на объект микроскопе. При настройке объект должен быть выведен из поля зрения, иными словами, после получения резкого изображения объекта предметное стекло смещается, чтобы поле зрения под объективом было прозрачным.

### 3.4.8. Работа с объективом масляной иммерсии

Порядок работы:

- Добиться четкого изображения объекта в поле зрения с помощью сухого объектива малого увеличения и определить наиболее подходящий для исследования участок препарата.

- Поворотом revolver вывести сухой объектив из хода лучей и сместить объективы так, чтобы стал свободным доступ к препарату.

- Нанести на выбранный участок препарата одну каплю иммерсионного масла. Капля должна свободно упасть на стекло (при этом желательно немного смазать иммерсионным маслом фронтальную линзу объектива).

*Пипетка капельницы масла ни в коем случае не должна соприкоснуться с мазком!*

В противном случае это может привести к переносу микобактерий с одного мазка на другой, к загрязнению иммерсионного масла и получению ложноположительного результата микроскопического исследования.

- Поворотом головки revolverного устройства установить объектив с сильным увеличением (90x – 100x) непосредственно над препаратом.

- Под визуальным контролем (глядя сбоку) медленно вращают макровинт грубой фокусировки и поднимают столик микроскопа **до появления мениска** в момент соприкосновения фронтальной линзы объектива с поверхностью капли масла.

*Никогда не касайтесь линзой предметного стекла. Это может повредить линзу или разбить препарат.*

- Глядя в окуляр, с помощью винтов грубой и точной регулировки произвести настройку на резкость. Во время выполнения этой манипуляции будьте особенно внимательны и смещайте винты на небольшой ход, не допуская бесконтрольно полного оборота винтов.

В случае появления в поле зрения пузырьков воздуха операцию настройки (момент соприкосновения фронтальной линзы объектива с иммерсией) необходимо повторить, протерев объектив салфеткой со спиртом.

Микроскоп готов к работе.

При микроскопическом исследовании мазка, окрашенного по *Ziehl-Neelsen*, следует просматривать не менее 100 полей зрения. В том случае, если результат такого исследования оказывается отрицательным, для необходимо просмотреть еще 200 полей зрения.

При микроскопическом исследовании препарата необходимо быть уверенным, что ни одно поле зрения препарата не просматривается повторно, поэтому рекомендуется просматривать препарат всегда по одной и той же схеме:

- либо 3 параллельных прохода по длине препарата,
- либо 9 параллельных проходов по ширине.

Микроскопировать начинают с левого верхнего выбранного в мазке поля зрения, постепенно передвигаясь либо вдоль продольной оси препарата до конца мазка, либо смещаясь вниз и затем вновь поднимаясь вверх и т.д., проходя все поля зрения до границы мазка.

При увеличении микроскопа 1000х, т.е. 100х для масляно-иммерсионного объектива и 10х для окуляра при исследовании одной длины мазка ( $\approx 20$  мм) за один продольный проход просматривается около 100 – 120 полей зрения (диаметр поля зрения – 0,16 – 0,2 мм).

При люминесцентной микроскопии с использованием объектива 25х и окуляра 10х площадь поля зрения примерно в 10 раз больше, поэтому просматривается меньшее число полей зрения. Однако при отрицательном результате или малом количестве выявляемых микобактерий следует просматривать не менее 100 полей зрения.

При значительном количестве кислотоустойчивых микобактерий достаточно исследовать 20 - 50 полей зрения как при окраске по *Ziehl-Neelsen*, так и при люминесцентной микроскопии (см. *Таблицу 3*).

По окончании микроскопического исследования каждого препарата следует:

- освободить препарат от держателей – клемм препаратоводителя;
- снять препарат с предметного столика микроскопа;
- сверить идентификационный номер и записать результат микроскопии на специальном листе бумаги, на котором перед началом

микроскопии написать в столбик порядковые номера препаратов, подлежащих исследованию;

- затем, удерживая препарат за ребра стекла в участке, где нанесен порядковый номер, положить препарат на покрытый фильтровальной бумагой поднос (лоток) в вытяжной шкаф;

- для удаления иммерсионного масла накрыть препарат полоской фильтровальной бумаги;

- смочить ее несколькими каплями ксилола, спирто-эфирной смесью или спиртом;

- через 2 - 3 минуты фильтровальную бумагу удалить;

- очищенный от иммерсионного масла препарат поместить в коробку для просмотренных стекол.

При большом количестве исследуемых препаратов рекомендуется заранее подготовить 2 высланных фильтровальной бумагой подноса (лотка) - для положительных и отрицательных препаратов - и удаление иммерсионного масла производить по окончании микроскопического исследования одновременно со всех просмотренных препаратов или части их.

В зависимости от результатов микроскопического исследования просмотренный препарат поместить в коробку для положительных или для отрицательных препаратов.

Перед тем, как взять для исследования следующий препарат, необходимо протереть иммерсионную линзу кусочком специальной ткани или марлевым тампоном с рекомендованным растворителем.

По окончании микроскопического исследования всей партии мазков выполнить следующие процедуры:

- с помощью бумажной или марлевой салфетки протереть линзы микроскопа спирто-эфирной смесью или спиртом;

- опустить предметный столик микроскопа, отдалив его от объективов;

- уменьшить интенсивность освещения и выключить источник освещения микроскопа;

- накрыть микроскоп полиэтиленовым или пластиковым пакетом;

- расставить все необходимое для микроскопии оборудование и дополнительные материалы в установленном порядке;

- снять и удалить одноразовые перчатки;

- вымыть руки с мылом;

- перенести результаты микроскопического исследования в лабораторный регистрационный журнал и на бланки ответов.

### 3.5. Причины ошибок при микроскопических исследованиях

#### 3.5.1. Ложноположительные результаты

Они могут быть обусловлены следующими причинами:

- плохая обработка многоразовых флаконов для сбора материала, в которых могут оставаться микобактерии;
- повторное использование предметных стекол после положительного предыдущего мазка;
- использование для приготовления мазка загрязненных бациллярным материалом бактериологических петель, пипеток или деревянных палочек;
- применение предметных стекол с царапинами и другими дефектами, в результате чего появляются артефакты, иногда ошибочно принимаемые за микобактерии; красная краска может иногда задерживаться на царапинах и создавать ошибочное представление о том, что видно кислотоустойчивую микобактерию. Такие царапины нередко образуют параллельные ряды. Обычно они более грубые и больше по размерам, чем микобактерии. Их несложно определить, так как они находятся на стекле в более глубокой плоскости (под мазком), и исчезают, если установить фокус на клетки (лейкоциты, эпителиальные клетки);
- использование плохо профильтрованного или длительно хранившегося раствора фуксина с начавшейся кристаллизацией;
- наличие микобактерий в иммерсионном масле, если иммерсионные линзы не были очищены после положительных препаратов или иммерсионное масло загрязнено микобактериями, если пипетка, которой оно наносится на мазок, случайно соприкасалась с положительным мазком;
- недостаточное обесцвечивание мазка, что может привести к сохранению красной окраски на некоторых некислотоустойчивых бактериях;
- волокна шерсти, хлопка, фильтровальной бумаги; обычно они встречаются как единичные находки, чаще всего в одном поле зрения;
- пыльца некоторых видов сосны, которая может обнаруживаться в виде редко встречающихся в препарате коротких кокковидных палочек.

#### 3.5.2. Ложноотрицательные результаты

Они могут быть обусловлены следующими причинами:

- плохим качеством или недостаточным количеством исследуемого материала;
- исследованием слюны вместо мокроты;
- нарушением условий хранения, транспортировки, консервации материала (высокая температура и низкая влажность, а также воздействие на материал прямого солнечного света или ультрафиолетового излучения, под влиянием которых содержащиеся в материале микобактерии могут утратить присущую им кислотоустойчивость);
- неудачным выбором частиц мокроты для приготовления мазка;
- приготовлением слишком тонкого или толстого мазка, плохой его фиксацией над пламенем горелки или несоблюдением режимов окрашивания (неправильная экспозиция при окраске);
- нарушением методики просмотра мазка (малое число просмотренных полей зрения);
- плохим качеством красителей и реагентов;
- хранение предназначенных для исследования окрашенных мазков в месте, доступном прямым солнечным лучам или ультрафиолетовому свету, парам кислот;
- при повторном просмотре мазков (реанализ) ложноотрицательный результат может быть обусловлен тем, что после первичного просмотра с препарата не было удалено иммерсионное масло (при длительном воздействии оно обесцвечивает окраску) или препарат тщательно протирали при удалении иммерсионного масла, что вызвало повреждение мазка.

#### 3.5.3. Операторские ошибки (ложноположительные или ложноотрицательные):

- неправильная маркировка флаконов с диагностическим материалом;
- отсутствие маркировки на стекле или повреждение ее в процессе окраски или обесцвечивания;
- неправильная регистрация результатов.

Таблица 2

**Возможные причины неисправностей при микроскопии  
и способы их устранения**

Неисправность	Возможная причина	Способ устранения
Тусклое поле зрения	Низкое положение конденсора. Закрытая диафрагма конденсора.	Поднять конденсор. Открыть диафрагму.
Темные объекты в поле зрения, смещающиеся при повороте окуляра	Грязный окуляр. Линзы микроскопа загрязнены грибами. На линзах окуляра имеются царапины.	Протереть окуляр. Необходим ремонт окуляра. Заменить окуляр.
Недостаточно четкое изображение	Перевернут препарат (мазок находится снизу стекла). Пузырек воздуха в масле.  Плохое качество масла. Загрязнены линзы.	Перевернуть предметное стекло. Передвинуть 100х объектив. Заменить масло. Протереть линзы.
Нечеткое изображение при малом увеличении	Поверхности линз загрязнены маслом или грязью. Повреждение линз.	Очистить линзы.  Заменить поврежденные линзы.

**Учет результатов микроскопического исследования**

**3.3. Учет результатов микроскопического исследования  
при окраске по методу *Ziehl-Neelsen***

Количество кислотоустойчивых микобактерий (КУМ), обнаруживаемых при микроскопическом исследовании, является очень важным информационным показателем, так как оно характеризует степень эпидемической опасности больного и тяжесть заболевания. Поэтому микроскопическое исследование должно быть не только качественным, но и количественным. При использовании объектива 90х или 100х и окуляра 7х -10х (общее увеличение – 630 – 1000х) целесообразна следующая градация результатов световой иммерсионной микроскопии (см. *Таблицу 3*).

Результаты микроскопического исследования отражаются в двух документах: в лабораторном регистрационном журнале учета микроскопических исследований и на бланках, на которых результаты

исследования сообщаются в направившее материал лечебное учреждение.

Таблица 3.

**Градация результатов микроскопического исследования при окраске по методу *Ziehl-Neelsen***

Результат исследования	Минимальное число полей зрения (п/з), обязательных для просмотра	Форма записи результата	Интерпретация результата исследования
КУМ не обнаружены в 300 п/з	300	ОТР	Отрицательный
1-2 КУМ в 300 п/з	300	Рекомендуется повторить исследование	Результат не оценивается
1-9 КУМ в 100 п/з	100	" ____ " КУМ в 100 п/з*	Положительный
10-99 КУМ в 100 п/з	100	1+**	Положительный
1-10 КУМ в 1 п/з	50	2+**	Положительный
Более 10 КУМ в 1 п/з	20	3+**	Положительный

\* Указать точное число найденных КУМ

\*\* Соответствие градаций:

Точное число - Единичные КУМ в препарате

1+ - Единичные КУМ в поле зрения

2+ - Умеренное количество КУМ

3+ - Значительное количество КУМ.

**3.6. Учет результатов микроскопического исследования при окраске флюорохромными красителями**

Мазки, окрашенные флюорохромными красителями, просматривают под значительно меньшим увеличением (обычно 250х — 630х), чем увеличение, используемое для просмотра мазков, окрашенных карболовым фуксином (1000х). В силу этого поле зрения,

просматриваемое под люминесцентным микроскопом, имеет значительно большую площадь, чем поле зрения светового микроскопа. Таким образом, в ответе о результатах исследования мазка, окрашенного флюорохромами, при увеличении в 250 раз будет содержаться значительно больше бактерий, чем при исследовании этого же препарата, окрашенного по *Ziehl - Neelsen* и просмотренного при увеличении в 1000 раз. Чтобы уменьшить погрешность в ответах при использовании разных увеличений, предложено при исследовании и количественной оценке мазков, окрашенных флюорохромами, количество выявленных кислотоустойчивых бактерий делить на «фактор увеличения». Такой пересчет позволяет получить примерное количество микроорганизмов, которое можно увидеть в том же мазке при увеличении в 1000 раз с окраской по *Ziehl-Neelsen* (см. Таблицу 4).

Пересчет результатов микроскопического исследования с использованием «фактора увеличения» позволяет получать сравнимые в различных лабораториях результаты, независимо от используемого метода окраски или степени увеличения:

Таблица 4.

**Соотношение результатов микроскопического исследования в зависимости от метода окраски и кратности увеличения**

Число КУМ при окраске по <i>Ziehl-Neelsen</i> и увеличении 1000х	Ответ	Число КУМ при окраске флюоресцентными красителями		
		Увеличение люминесцентного микроскопа		
		250х	450х	630х
0	КУМ не обнаружены	0	0	0
1 – 9 в 100 полях зрения	Указать точное число	Разделить результат на 10	Разделить результат на 4	Разделить результат на 2
10 – 99 в 100 полях зрения	1 +			
1 – 10 в 1 поле зрения	2 +			
> 10 в 1 поле зрения	3 +			

Пример: Предположим, что при увеличении в 450 раз было выявлено 20 КУМ в 1 поле зрения. Если, в соответствии с таблицей, это число разделить на "фактор увеличения" 4, соответствующее число микобактерий, которое можно увидеть при увеличении в 1000 раз,

будет 5 микобактерий в 1 поле зрения. Поэтому при выдаче результата следует указать "2+", а не "3+", как можно было бы оценить по первой колонке при выявлении 20 КУМ в 1 поле зрения.

Результаты исследования всех мазков должны регистрироваться в лабораторном журнале, который должен содержать следующую информацию:

- порядковый лабораторный номер;
- фамилия больного;
- пол;
- возраст;
- адрес больного;
- районный регистрационный номер больного;
- название медицинского учреждения, направившего материал на исследование;

— номер истории болезни;

— основание для проведения исследования (диагностика или мониторинг результатов химиотерапии);

— результат микроскопического исследования.

Положительные результаты исследования рекомендуется вписывать в журнал красными чернилами.

Затем на основании записей в лабораторном журнале необходимо подготовить индивидуальные ответы для каждого больного, используя специальные бланки ответов.

Ответ с результатами микроскопического исследования следует выдавать как можно быстрее, желательно - не позже, чем через 24 часа после получения проб.

В бланке ответа на микроскопическое исследование должны содержаться следующие сведения:

- паспортные данные пациента;
- наименование учреждения исполнителя;
- наименование учреждения отправителя;
- материал;
- использованный метод окраски и микроскопии;
- среднее количество кислотоустойчивых микобактерий в мазке;
- выявление больших скоплений микроорганизмов, что может свидетельствовать о гораздо большем количестве бактерий, чем указано в заключении;
- дата исследования и фамилия сотрудника, проводившего анализ.

Результат следует отправлять в медицинское учреждение, приславшее пробы.

*Никогда не ограничивайтесь выдачей результата пациенту !*

### 3.8. Контроль качества микроскопических исследований для выявления кислотоустойчивых микобактерий

Целью введения контроля качества является обеспечение условий проведения исследований, при которых достигается чувствительность и специфичность метода, заложенные в его характеристику.

Контроль качества лабораторных исследований осуществляется в нескольких формах:

- внутрилабораторный контроль качества выполняемых исследований;
- внешний контроль качества микроскопических и культуральных лабораторных исследований, включающий:
  - заочную оценку качества с использованием аттестованных контрольных образцов;
  - повторный анализ клинических образцов и препаратов в лабораториях более высокого уровня;
  - инспекционный контроль, осуществляемый в рамках лицензирования и аккредитации, в том числе кураторские визиты.

#### 3.8.1. Внутрилабораторное обеспечение качества микроскопических исследований

Важным элементом обеспечения качества выполняемых исследований является **регулярное** осуществление внутрилабораторного контроля качества микроскопических исследований, который позволяет осуществлять эффективное и систематическое наблюдение за проводимой в лаборатории работой.

Контроль качества осуществляется на всех технологических этапах микроскопического исследования:

- оценки качества поступающих проб;
- контроля за соблюдением рецептуры и методики приготовления реагентов и красителей;
- правил и сроков хранения реагентов и красителей;
- наблюдения за неукоснительным соблюдением методических приемов при:
  - приготовлении мазков (включая качество предметных стекол);
  - окраске мазков;
  - проведении микроскопического исследования;
- регулярного контроля качества используемых химических реактивов и сроков хранения, исправности оборудования;
- периодического контроля результатов бактериоскопии;
- проверки правильности учета и регистрации результатов.

Кроме того, элементами внутрилабораторного контроля качества является проверка правильности:

- организации рабочих мест (приема и регистрации материала, приготовления и окраски мазков, микроскопирования);
- настройки оборудования;
- микроскопирования положительных и отрицательных контрольных образцов;
- своевременности и точности передачи результатов в учреждение, направившее материал для исследования. Успех применения контроля качества обеспечивается:
- регулярным его применением в лабораторном подразделении;
- правильно обученными, заинтересованными и ответственными работниками;
- рациональным применением регламентированных методов;
- анализом допущенных ошибок и немедленным их исправлением.

Одной из форм обеспечения качества бактериоскопических исследований является использование в ряду клинических мазков двух дополнительных не окрашенных контрольных мазков, один из которых заведомо является положительным, а второй – отрицательным мазком. Просмотр мазков начинают с контрольных, затем просматривают клинические мазки.

Необходимо еженедельно и ежемесячно обобщать и анализировать полученные данные для определения процента положительных результатов и, по возможности, определять причины любых резких отклонений от средних показателей. При получении в процессе микроскопии подряд нескольких положительных результатов необходимо внимательно проанализировать причины этого.

*За обеспечение качества исследований несут ответственность все сотрудники лаборатории.*

#### 3.8.2. Внешняя оценка качества микроскопических исследований с использованием контрольных образцов

На территории Российской Федерации функционирует Федеральная система внешней оценки качества (ФСВОК) клинических лабораторных исследований, которая контролирует клинико-диагностические и бактериологические лаборатории путем заочной оценки качества с использованием контрольных образцов совместно с Федеральной и региональными референс-лабораториями противотуберкулезной службы МЗ РФ.

Деятельность системы основана на регулярной проверке правильности выполняемых лабораторией исследований и предоставлении информации о результатах оценки их качества. Участие в ФСВОК является одним из основных и обязательных видов деятельности клинико-диагностических и бактериологических лабораторий по обеспечению требуемого качества выполняемых исследований.

Внешняя оценка качества клинических лабораторных исследований позволяет своевременно выявить недостатки в работе клиничко-диагностических подразделений, оказать организационно-методическую и консультативную помощь участвующим в ФСВОК лабораториям, выработать адекватные рекомендации по устранению обнаруживаемых ошибок и совершенствованию используемых методик.

Внешнюю оценку качества микроскопических исследований для выявления кислотоустойчивых микобактерий осуществляют совместно с Центром внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований МЗ РФ Федеральная и региональные референс-лаборатории противотуберкулезной службы.

#### *8.8.3. Повторный анализ клинических образцов и препаратов в лабораториях более высокого уровня*

Определенная доля исследованных и сохраненных мазков подвергается повторному анализу в курирующих лабораториях по установленным правилам.

Лаборатория должна соблюдать правильность хранения препаратов, обеспечивая их целостность и исходное качество, при котором получен результат. Препараты должны сопровождаться соответствующими документами. Обычно реанализу подвергают все положительные мазки и каждый десятый отрицательный.

#### *3.8.4. Инспекционный контроль качества микроскопических исследований*

Инспекционный контроль (кураторские визиты) осуществляется с целью проведения текущей оценки основных показателей работы лабораторий и проверки достоверности получаемых в ней результатов микроскопических исследований путем очной проверки деятельности лабораторий при их посещении представителями лицензирующего органа и курирующей лаборатории.

Кураторские визиты являются наиболее эффективными методами оперативного контроля качества лабораторной диагностики. План проведения кураторских визитов и основные разделы работы лаборатории, подлежащие проверке, определяются заранее.

### **3.9. Организация и управление работой лаборатории.**

#### **Общие правила безопасности при организации исследований**

В связи с высокой трансмиссивностью микобактерий туберкулеза и, как следствие, с высоким риском заболевания среди сотрудников микробиологических подразделений устройство лаборатории, расположение и организация рабочих мест должны предотвращать как развитие внутрибольничной туберкулезной инфекции, так и

контаминацию рабочих мест, а также обеспечивать необходимые меры биологической безопасности при работе персонала с возбудителем туберкулеза, исключения физических и химических рисков при работе в лаборатории.

Необходимые мероприятия должны включать (см. Раздел 3 настоящей Инструкции):

а) административные меры, предотвращающие распространение инфекционных аэрозолей из загрязненных зон в неинфицированные помещения лаборатории и лечебного учреждения в целом;

б) инженерные (проектные и технические) мероприятия, направленные на снижение концентрации инфекционных аэрозолей в воздухе (принудительная вентиляция, использование специализированных устройств обеззараживания воздуха);

в) меры персональной защиты персонала (защитные маски, респираторы, одежда, перчатки).

Во время работы двери в лабораторию должны быть закрыты. Расположение рабочих зон, оборудования и реагентов должно быть постоянным и логичным - в соответствии с последовательностью выполнения работы и соблюдением эпидемиологической цепочки. Рабочие помещения должны содержаться в чистоте и обеззараживаться бактерицидными лампами (не менее 40 минут перед началом работы и в конце рабочего дня). Столы должны протираться раствором соответствующего дезинфицирующего средства (например, 5% раствором хлорамина)<sup>1</sup> два раза в день – перед началом работы и после ее окончания. Эффективность ультрафиолетовых облучателей зависит от влажности и степени загрязненности воздуха и рабочих поверхностей, что необходимо учитывать при проведении санитарных гигиенических мероприятий в лаборатории.

**Помещения лаборатории** должны быть удобными в расположении, не иметь порогов и функционально пригодными для предназначенных работ.

У каждого рабочего места должны быть вывешены методические инструкции по проведению выполняемых на этом месте рабочих процедур. Все манипуляции на каждом рабочем месте должны выполняться в строгом соответствии с инструкцией. Любые изменения

<sup>1</sup> Дезинфицирующие средства, используемые в лабораториях в противотуберкулезных целях, содержат фенолы, гипохлориты, спирт, формальдегиды, йодофоры и глутаральдегиды. Тип дезинфицирующего вещества зависит от материала, подлежащего дезинфекции. Не следует пользоваться ароматизированными "антисептиками". Неверно распространенное мнение о том, что дезинфицирующие средства, эффективные против различных видов микроорганизмов, столь же эффективны и против микобактерий. Целый ряд распространенных дезинфектантов обладают незначительной или не обладают вовсе микобактерицидной активностью, а средства на основе четвертичного аммония неэффективны в рекомендуемых концентрациях. Перекиси водорода в низких концентрациях (менее 3% также мало эффективны в отношении микобактерий туберкулеза).

вносятся в эти документы только по указанию заведующего лабораторией и должны быть завизированы его подписью с указанием даты изменения методики.

Все документы должны храниться в течение 2 лет.

В работе должны использоваться методы лабораторных исследований, которые регламентированы в нормативных документах и зарегистрированы в реестре Минздрава РФ.

### **Лабораторное оборудование**

Оборудование должно полностью удовлетворять стандартным требованиям и спецификациям.

Технические паспорта всего оборудования и инструкции по применению оборудования и уходу за ним необходимо хранить в специальной папке.

Для обеспечения точности и правильности работы оборудование должно регулярно проверяться специалистом соответствующего профиля.

Для регистрации профилактических осмотров всего оборудования следует иметь отдельный журнал.

В случае возникновения неисправности в работе того или иного прибора работа на нем немедленно прекращается. И прибор консервируется до прихода специалиста по ремонту и эксплуатации данного прибора.

### **Правила хранения и эксплуатации микроскопов**

Срок службы микроскопа рассчитан на 10 лет с учетом естественного старения. Микроскоп является точным и дорогостоящим прибором, поэтому требует очень бережного обращения как с механической его частью, так и с оптикой. При этом вовсе не обязательно знать устройство и работу микроскопа в деталях — этим должны заниматься профессионалы. Однако иметь представление о правилах настройки и работы с микроскопом, и хранении необходимо работникам лаборатории.

Технические правила эксплуатации прилагаются к микроскопу.

- Если микроскоп временно не используется, его следует хранить в футляре или накрывать пластиковым чехлом.

- Повышенная влажность воздуха помещения может способствовать размножению на линзах плесневых грибов и появлению ржавчины на металлических частях прибора. Для снижения влажности воздуха в футляр микроскопа следует поместить чашку Петри с цветным силикагелем (имеет голубой цвет). Когда силикагель насытится влагой, его цвет изменится с голубого на розовый. В таком случае силикагель можно заменить новым или дегидратировать его в сушильном шкафу. После восстановления первоначального цвета силикагель можно использовать повторно.

- Для удаления налета плесневых грибов с линз объектива используется тампон, смоченный в растворе противогрибкового препарата. При необходимости такую обработку можно повторить, а

затем насухо протереть линзы специальной мягкой тканью. Линзы окуляров не протирают растворителями.

- Нельзя хранить микроскоп поблизости от химических реактивов и кислот, а также в помещениях или местах с высокой влажностью.

- При переноске микроскопа следует держать его двумя руками — за штатив и за основание. Нельзя переносить микроскоп, держа его только одной рукой. Следует избегать необоснованно частых передвижений микроскопа.

- Микроскоп следует устанавливать на прочной ровной поверхности. В непосредственной близости от него нельзя устанавливать оборудование, вызывающее вибрацию (например, центрифуги).

- Если микроскоп используется каждый день, желательно держать его на одном постоянном месте, накрывая после работы полиэтиленовым или пластиковым чехлом.

- На линзах микроскопа от грязи или песчинок могут появиться царапины. Объективы и окуляры протираются только специальной мягкой тканью для линз или безворсовыми салфеткой или тампоном.

- Не следует допускать попадания иммерсионного масла на предметный столик микроскопа. Во избежание контаминации мазков в процессе микроскопического исследования и получения ложноположительных результатов после просмотра каждого очередного препарата следует тщательно вытирать объектив от иммерсионного масла.

- Необходимо следить, чтобы иммерсионное масло не попадало на неиспользуемые объективы, находящиеся в револьвере микроскопа. При случайном загрязнении необходимо сразу же тщательно их вытереть.

- Нельзя разбирать микроскоп; в случае появления какой-либо неисправности ремонт должен производиться только специалистом.

Для сохранения микроскопа в рабочем состоянии необходимо соблюдать следующие правила:

*После использования в течение рабочего дня необходимо:*

- проверить фиксацию объективов в револьверном устройстве;
- удалить с помощью ксилола, спирто-эфирной смеси или 70° спирта масло с объектива, конденсора и предметного столика;
- несколько приподнять предметный столик, не допуская соприкосновения с ним объективов, но в то же время и не оставляя их на длительное время в верхнем положении;
- установить регулятор напряжения на минимальное значение;
- выключить источник света;
- накрыть микроскоп чехлом.

Так как основными загрязнителями оптической системы микроскопов и наиболее частой причиной их выхода из строя являются пыль и грибы, во внерабочем состоянии микроскоп всегда должен быть накрыт чехлом и храниться в сухом помещении.

Для сохранности иммерсионных объективов следует обратить особое внимание на правильное выполнение их очистки от остатков иммерсионного масла. Очистку объектива рекомендуется производить следующим образом:

- вывинтить объектив из револьверного устройства или установить его в положение, удобное для чистки;
- сухой салфеткой одним движением руки снять иммерсионное масло с передней линзы объектива;
- смочить другую салфетку в смеси спирта и эфира с таким расчетом, чтобы она была слегка увлажненной;
- аккуратно протереть линзу объектива; при сильном загрязнении операцию можно повторить, используя чистый вновь смоченный тампон;
- по окончании очистки линзу протирают сухим тампоном.

Операции очистки следует проводить очень аккуратно и осторожно; необходимо следить за степенью увлажненности салфетки; она должна быть слегка увлажнена растворителем.

*Ежемесячно необходимо:*

- удалить пыль с корпуса микроскопа специальной щеткой с подачей воздуха (простое устройство может быть сделано из пастеровской пипетки и прикрепленной к ней резиновой груши);
- очистить объективы, окуляры и конденсоры тампоном или кусочком специальной ткани, смоченной ксилолом, спирто-эфирной смесью или спиртом;
- снять с предметного столика препаратодержатель предметных стекол и очистить его;
- протереть влажной тканью отверстие источника света в основании микроскопа.

*Через каждые 6 месяцев* микроскоп должен подвергаться профилактическому осмотру, чистке и смазке, которые проводятся специалистом.

### ***Исследуемый материал и бланки исследований***

- Микроскопическое исследование производится только при наличии письменного направления на исследование от уполномоченных лиц.
- По устной просьбе, не подтвержденной получением соответствующих документов, исследования не проводятся.
- Бланки направлений на исследование хранятся отдельно от полученного материала. Загрязненные бланки перед регистрацией в лабораторном журнале стерилизуются в сухожаровом шкафу или (при отсутствии шкафа) проглаживаются горячим утюгом.
- Бланки направлений должны быть правильно оформлены, а каждая полученная проба диагностического материала правильно промаркирована. Не следует производить исследование безымянных проб или проб с неправильно оформленными направлениями.

- При регистрации необходимо оценить качество пробы, чтобы отобрать и отделить пробы, содержащие слюну. Ответ может быть сформулирован следующим образом: "Поступившая проба похожа на слюну. Рекомендуется повторить сбор мокроты". Диагностический материал в виде слюны может быть исследован только при прямом назначении врача в исключительных случаях, когда другой диагностический материал не может быть собран.

- Для сокращения затрат времени на оформление ответов можно использовать резиновые штампы со стандартными формулировками.

- Протекшие или поврежденные флаконы с материалом следует немедленно удалить, подвергнуть автоклавированию и запросить новую (повторную) пробу.

- На бланке направления на исследование необходимо отметить время доставки материала в лабораторию и фиксировать любые задержки в поступлении проб, что имеет особое значение при отрицательных результатах.

- Следует указывать примерный объем полученной для исследования пробы мокроты.

### ***Реактивы и красители***

- Все флаконы с реактивами и красителями заводского производства должны иметь отметку о дате получения и вскрытия заводской упаковки. Любые некачественные материалы следует специально пометить и немедленно удалить из лаборатории.

- В лаборатории или на складе следует иметь запас реактивов и расходных материалов на 6 месяцев работы.

- Необходимо регулярно контролировать сроки годности препаратов и реактивов и обновлять запасы, чтобы не было материалов с истекшим сроком хранения.

### ***Окрашивание и исследование мазка***

- При окраске мазков не следует помещать на штатив («рельсы») и окрашивать одновременно более 12 стекол. Соприкосновение стекол боковыми краями может привести к переносу краски и микобактерий с одного стекла на соседние.

- В процессе окраски мазков при их промывании проточной водой не следует пользоваться резиновыми трубками или наконечниками для направления струи воды на препарат. В окружающей среде и водопроводной воде содержится значительное количество кислотоустойчивых сапрофитов, которые легко размножаются на резиновых поверхностях в условиях повышенной влажности. Во время промывания мазков при прохождении струи воды через загрязненные микобактериями резиновые трубки или наконечники микобактерии могут попасть на препарат и обусловить ложноположительный результат анализа.

- В число исследуемых мазков, подлежащих окрашиванию, необходимо ежедневно включать контрольные неокрашенные положительный и отрицательный препараты. Вначале микроскопируют контрольные мазки, а затем — мазки от больных.

Окрашенные для исследования мазки не пригодны, если

*При окраске карболовым фуксином*

- в положительном контрольном мазке микобактерии не окрашены в красный цвет;
- в отрицательном контрольном мазке после обесцвечивания видны красные клетки;
- не произошло достаточного обесцвечивания фона.

*При окраске флюорохромными красителями:*

- отрицательные контрольные мазки дают флюоресцирующее свечение;
- в положительных контрольных мазках не обнаруживаются светящиеся микобактерии или они дают тусклую флюоресценцию;
- фон недостаточно обесцветился или имеет флюоресцентное свечение.

*По окончании микроскопического исследования необходимо:*

- с помощью ксилола, спирто-эфирной смеси или спирта удалить с препарата иммерсионное масло и поместить препараты в отдельные коробки, где они сохраняются для последующего проведения внешнего контроля качества или перепроверки результата микроскопии.
- не следует очищать стекло слишком энергично, чтобы не повредить препарат и не удалить с него краску;
- все положительные и отрицательные мазки необходимо укладывать в отдельные коробки для сохранения в том порядке, в котором проводилось исследование, чтобы в дальнейшем можно было провести внешний контроль качества в соответствии с установленным порядком.

### ***Выдача ответов и администрирование***

— Результаты микроскопического исследования следует передавать в медицинское учреждение или непосредственно врачу, направившему материал на исследование.

— Результаты бактериоскопии следует отправлять как можно быстрее — желательно в течение 24 часов с момента получения проб мокроты.

— Необходимо еженедельно и ежемесячно обобщать и анализировать полученные данные для ведения статистики исследований.