

**ИНСТРУКЦИЯ  
ПО УНИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДАМ  
МИКРОСКОПИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ  
КИСЛОТУСТОЙЧИВЫХ МИКОБАКТЕРИЙ  
В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ  
ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ**

Обнаружение кислотоустойчивых микобактерий в диагностическом материале имеет важное значение для выявления бактериовыделителей - наиболее эпидемически опасных больных туберкулезом.

Присутствие кислотоустойчивых микобактерий в диагностическом материале может быть установлено при микроскопическом и/или культуральном исследовании. Однако микроскопическое исследование не позволяет дифференцировать микобактерии комплекса *Mycobacterium tuberculosis* (возбудителей туберкулеза) от нетуберкулезных («атипичных») микобактерий - возбудителей микобактериозов, а также кислотоустойчивых сапрофитов, не вызывающих заболевания человека. Тем не менее, оно остается одним из основных на первичных этапах обследования больных, а также при динамическом наблюдении за состоянием микобактериальной популяции в процессе лечения. Преимущество бактериоскопии заключается в скорости получения результата (от 1 часа) и относительной простоте исследования.

Видовая идентификация микобактерий, позволяющая с уверенностью отнести выявленные кислотоустойчивые микроорганизмы к возбудителю туберкулеза, возможна только при выделении культуры микобактерий.

## I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Метод прямой бактериоскопии является методом быстрого, доступного и экономически эффективного выявления и оценки содержания кислотоустойчивых микобактерий в нативном диагностическом материале (чаще всего в мокроте) без предварительной гомогенизации и обработки детергентами;

Исследование осуществляется с помощью световой микроскопии мазков, окрашенных по *Ziehl-Neelsen*, или люминесцентной микроскопии с окраской флюорохромными красителями. Результаты выражаются в полуколичественных категориях, отражающих содержание микобактерий в исследуемом препарате.

## II. ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

Метод осуществляется в клиничко-диагностических лабораториях ОЛС при проведении первичного обследования у лиц с подозрением на заболевание туберкулезом:

- у лиц, обращающихся за медицинской помощью с респираторными жалобами и/или
- с симптомами интоксикации, характерными для туберкулеза («выявление по обращаемости»),
- у лиц с изменениями, выявленными лучевыми методами, а также
- при активном обследовании лиц, входящих в группы риска по заболеванию туберкулезом.

Первичное бактериоскопическое обследование осуществляется всеми лечебно-профилактическими учреждениями системы здравоохранения и составляет диагностический минимум, дополняя клиничко-рентгенологические симптомы, данные анамнеза пациента.

При положительных или сомнительных результатах первичного обследования, а также при отрицательных, но с наличием клиничко-рентгенологических симптомов, пациент направляется в противотуберкулезное учреждение для подтверждения или исключения диагноза туберкулеза более совершенными диагностическими методами

Противопоказаний к применению метода нет. Однако следует помнить, что результаты бактериоскопии не могут быть единственным основанием при постановке клиничческого диагноза.

## III. ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ КИСЛОТУСТОЙЧИВЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

Пределы метода световой микроскопии при окраске мазков по *Ziehl - Neelsen* позволяют выявить кислотоустойчивые микобактерии при их содержании порядка 5 000 - 10 000 и более микробных клеток в 1 мл мокроты, что характерно для больных с прогрессирующими формами процесса. Больные с малыми формами заболевания без деструкции легочной ткани выделяют значительно меньшее количество микобактерий, что может быть ниже предела обнаружения методом микроскопического исследования.

Чувствительность этого метода можно повысить, используя кратность обследования пациента. В большинстве стран при первичном выявлении больного туберкулезом практикуется сбор и исследование не менее 3 проб мокроты. Результаты многочисленных исследований показали, что многократные микроскопические обследования больного позволяют распознавать более 90% случаев бациллярных форм туберкулеза. Установлено, что результативность микроскопической диагностики легочного туберкулеза повышается следующим образом: при однократном исследовании выявляется 80-83% бактериовыделителей, двукратном - на 10-14% больше и при исследовании трех проб мокроты - еще на 5-8% больше.

Таким образом, при подозрении на легочную форму туберкулеза следует исследовать не менее трех проб мокроты.

Эффективность бактериоскопии существенно возрастает, если контролируется качество собираемого материала. Нарушение технологий подготовки мазков может быть причиной отрицательного результата микроскопического исследования.

Отрицательный результат микроскопического исследования не исключает диагноз туберкулеза, так как в мокроте пациентов может содержаться меньше микобактерий, чем позволяет выявить микроскопия.

#### **IV. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОЧЕГО МЕСТА И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В лабораториях, функции которых ограничены только микроскопическим исследованием мазков из нативного материала, рекомендуется использовать световую микроскопию. Микроскопическое исследование на кислотоустойчивые микобактерии должно проводиться в отдельной комнате с соблюдением правил безопасности и поточности движения и обработки материала. В объединенных клиничко-диагностических лабораториях для микроскопических исследований на кислотоустойчивые микобактерии должно выделяться отдельное помещение. Стены, потолки и полы должны быть покрыты гладким, не адсорбирующим материалом, который можно легко мыть и дезинфицировать. Кроме того, этот материал должен быть устойчивым к химическим реактивам, используемым в лаборатории. Пол не должен быть скользким, межкомнатные пороги отсутствовать. Необходимо достаточное освещение.

В помещении для микроскопии должно быть четыре зоны:

*I. Зона для приема и регистрации диагностического материала:*

1. Окно для приема образцов;
2. Рабочий стол для осмотра, дезинфекции и последующей регистрации поступающих образцов;

3. Полка для хранения бланков с результатами анализов.

*II. Зона для приготовления и окраски мазков:*

4. Стол для приготовления мазков (желательно под вытяжкой или в боксе с наличием вытяжного устройства);

5. Контейнер для отработанных инфекционных материалов;

6. Лабораторная раковина для окрашивания мазков;

7. Вспомогательный рабочий стол для сушки мазков.

*III. Рабочее место для микроскопии:*

8. Стол для микроскопии;

9. Раковина для мытья рук.

*IV. Место для регистрации результатов исследований:*

10. Стол для учета и регистрации результатов исследований;

11. Рабочий стол и весы;

12. Шкаф для посуды и реактивов.

Помещение должно иметь, по крайней мере, 2 раковины (или одну раковину с двумя отделениями – для окраски мазков и для мытья рук) и четыре стола или 4 изолированных рабочих места.

Столы должны быть удобными для работы. Рабочие поверхности должны быть широкими, гладкими, легко обрабатываться и дезинфицироваться, быть устойчивыми к применяемым химическим веществам.

В лаборатории должны использоваться стулья, высоту сиденья которых можно регулировать.

Необходимо иметь достаточно места для хранения реактивов и архива исследованных мазков.

Доступ в лабораторию должны иметь только ее сотрудники. Диагностический материал поступает в лабораторию через окно для приема на специальный стол. На этом столе должен иметься специальный легко дезинфицируемый лоток, на котором производят осмотр флаконов с материалом. При наличии следов протечки необходимо уничтожить (автоклавирование или кипячение) поврежденный флакон, продезинфицировать обнаруженные вне его следы протечки и запросить новый образец, сделав отметку в сопроводительном бланке.

По завершении приема материала, проверки правильности маркировки поступивших образцов и ее соответствия данным направлений и сопроводительных документов соответствующую информацию вносят в регистрационный лабораторный журнал. Затем материал передают в основную рабочую зону для приготовления мазков.

Место для микроскопии включает рабочий стол с микроскопом.

По завершении микроскопического исследования в следующей зоне лаборатории результаты микроскопии заносят в лабораторный регистрационный журнал и в специальные бланки результатов анализа.

Бланки с результатами анализов передают в зону приема материала, откуда они передаются в соответствующие подразделения или учреждения, направившие материал для исследования.

Рекомендуемый список оборудования, реактивов и расходных

материалов, необходимых для работы лабораторий, осуществляющих прямую микроскопию мазка с окраской по *Ziehl-Neelsen* или флюорохромными красителями, представлен в Приложении № 1 настоящей инструкции.

## V. РЕЖИМЫ И КРАТНОСТЬ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ

При первом обращении больного к врачу с симптомами, подозрительными на туберкулез, необходимо в течение 2-3 дней исследовать не менее 3 порций мокроты, собранных под наблюдением медицинского персонала.

Для того, чтобы уменьшить число ежедневных визитов пациента в лечебное учреждение для посещения врача и сдачи 3 утренних проб мокроты (это потребует 3-4 последовательных визита), практикуется следующая тактика.

*Первую* пробу мокроты пациент собирает при первом посещении лечебного учреждения под непосредственным наблюдением медицинского работника (см. ниже). По завершении процедуры сбора мокроты пациент получает стерильный флакон для сбора мокроты на следующий день. Одновременно медицинский работник, ответственный за сбор материала, объясняет пациенту необходимость сбора мокроты и правила ее сбора в домашних условиях.

*Вторую* пробу пациенту предлагается собирать самостоятельно утром следующего дня и доставить ее в лабораторию.

*Третью* проба собирается под наблюдением медицинского работника в день второго посещения после сдачи второй пробы материала.

Результативность бактериоскопического исследования 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.

## VI. СБОР ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Материал для исследования на кислотоустойчивые микобактерии собирают в стерильные флаконы с плотно закрывающимися 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 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 использовать флаконы одноразового применения (контейнеры для сбора материала), изготовленные из горючего материала, легко поддающегося расплавлению при автоклавировании или сжигании;
- флаконы должны иметь удобные, плотно закрывающиеся или герметически закрывающиеся крышки;
- объем флаконов должен составлять 20—50 мл, что вполне достаточно для проведения всех видов исследований;
- флаконы должны иметь широкое отверстие (не менее 35 мм в диаметре), чтобы пациент мог легко сплевывать мокроту внутрь флакона, не подвергая загрязнению его 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 хранения, транспортировки и проведения исследования;

При отсутствии возможности использовать одноразовые флаконы можно применять толстостенные флаконы из стекла (карманные плевательницы многократного пользования).

Перед выдачей пациенту такие плевательницы должны быть подвергнуты стерилизации, тщательно вымыты и повторно простерилизованы. При применении флаконов многократного пользования во избежание лабораторного загрязнения диагностического материала необходимо постоянно следить за качеством мытья и стерилизации этих флаконов.

Для получения оптимальных результатов при исследовании клинических материалов необходимо соблюдать следующие условия:

- при исследовании мокроты желательно соблюдать правила сбора материала, изложенные выше;
- собранный материал необходимо как можно быстрее доставлять в лабораторию; в случае невозможности немедленной доставки материал сохраняется в холодильнике при 5-10°C не более 3 дней; при более длительном хранении во избежание получения неверных результатов необходима консервация материала;
- при перевозке материала необходимо тщательно следить за сохранностью флаконов и точностью маркировки.

Для исследования на туберкулез используется разнообразный материал. Так как туберкулез легких является наиболее частой формой туберкулезного поражения, основным материалом составляют мокрота и другие виды отделяемого трахеобронхиального дерева.

**При легочных процессах** чаще всего исследуют следующие материалы: мокроту; отделяемое верхних дыхательных путей, полученное после аэрозольной ингаляции; промывные воды бронхов; бронхоальвеолярные смывы; материал, получаемый при бронхоскопии, транстрахеальной и внутрилегочной биопсии; аспират из бронхов; мазки из гортани; экссудаты; 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 персонала.

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 закручивающейся 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 ему отхаркивающее средство или применить раздражающие ингаляции. Последние провоцируют усиление секреции бронхов, кашель и отделение мокроты. Собранный таким образом материал не подлежит консервации, поэтому приготовление мазков из такого материала необходимо производить в день его сбора.

Для аэрозольных ингаляций пользуются портативными или стационарными аэрозольными ингаляторами. Для проведения ингаляции рекомендуется использовать раствор, в 1 л которого содержится 150 г хлорида натрия (NaCl) и 10 г бикарбоната натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). В целях предотвращения загрязнения раствора кислотоустойчивыми сапрофитами, которые нередко содержатся в водопроводной воде и могут привести при микроскопическом исследовании к получению ложноположительного результата, для приготовления раствора используется стерильная дистиллированная вода. Для провокации выделения мокроты необходимо вдохнуть от 30 до 60 мл подогретого до 42 - 45°C раствора. Продолжительность ингаляции должна составлять не менее 10 - 15 минут. Так как вдыхаемый во время процедуры ингаляции раствор вызывает усиленную саливацию еще до появления кашля и отделения мокроты, в первые минуты после завершения процедуры 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 направлении 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 содержимого, поэтому пациенту рекомендуется в течение суток после ингаляции собрать мокроту для второго исследования.

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

**Промывные воды бронхов.** Сбор промывных вод бронхов производится врачом-оториноларингологом, поэтому эта процедура доступна только в тех лечебных учреждениях, в которых имеется такой специалист. 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.

Более информативным материалом для исследования является материал, получаемый при бронхологических исследованиях: аспират из трахеи и дренирующих 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 забором материала для нейтрализации желудочного содержимого пациенту дают выпить 100-150 мл раствора питьевой соды (1 чайная ложка питьевой соды на 1 стакан воды). Раствор приготавливается 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 забирать через 30 мин после аэрозольной ингаляции. Такая комбинация двух указанных методов позволяет получать 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 удастся получить материал даже при провоцирующих ингаляциях.

**При внелегочных формах заболевания** микобактерии могут поражать практически любой орган, поэтому для исследования пригоден самый разнообразный материал: различные тканевые жидкости (спинномозговая, плевральная, перикардальная, синовиальная, асцитическая, кровь, гной), пунктаты костного мозга, резецированные ткани того или иного органа, полученные при биопсиях или оперативных вмешательствах, гнойно-некротические массы, грануляции, соскобы синовиальных оболочек, лимфатические узлы или пунктаты их содержимого.

Жидкий материал подлежит обязательному центрифугированию с последующей микроскопией осадка.

При внелегочных формах туберкулеза наряду с материалом из очага поражения желательнее параллельно исследовать мокроту, так как внелегочные формы туберкулеза нередко сочетаются с поражением органов дыхания.

**Моча** (средняя или вся утренняя порция) собирается в стерильную посуду после тщательного туалета наружных половых органов. В лаборатории мочу центрифугируют, используя метод накопления осадка. В дальнейшем исследуют осадок.

В связи с высокой опасностью загрязнения мочи при сборе и низкой результативностью микроскопического исследования анализ мочи на микобактерии должен предусматривать обязательное трехкратное исследование осадка.

## **VII. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**

**Хранение материала.** Если в данном учреждении не проводятся микроскопические исследования на выявление кислотоустойчивых микобактерий, собранный диагностический материал должен как можно быстрее централизованно доставляться в лабораторию. До момента отправки в лабораторию герметично закрытые флаконы с материалом хранятся в холодильнике, который по окончании каждого рабочего дня опечатывается и запирается. Срок сохранения материала в холодильнике без добавления консервирующих средств не должен превышать 48-72 часа. При более длительном хранении необходимо применить консервирующие средства.

**Транспортировка.** Во время транспортировки материал следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей и тепла. Если транспортировка и хранение занимают не более 48-72 часов, материал можно пересылать без консервации. В летний период (особенно в районах с теплым климатом) консервация необходима, если транспортировка занимает более 24 часов. В условиях Крайнего Севера диагностический материал может подвергаться воздействию значительных колебаний температуры. Необходимо иметь в виду, что

допускается пересылка материала в замороженном состоянии без консервации. Недопустимо после размораживания повторное замораживание диагностического материала, что ведет к нарушению структуры и тинкториальных свойств бактериальных клеток.

Для транспортировки материала рекомендуется пользоваться биксами или специальными транспортировочными ящиками (контейнерами) с мягкими легко стерилизующимися прокладками на дне и с гнездами или прокладками для флаконов и/или пробирок. Флаконы или пробирки (желательно пластиковые одноразового использования) с диагностическим материалом должны быть плотно закупорены или снабжены закручивающимися крышками с прокладками. Во избежание протечки жидких материалов и нарушения целостности флаконов они должны быть закреплены в транспортировочных ящиках в вертикальном положении и снабжены внешними 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 при транспортировке они не должны касаться друг друга.

Каждая проба материала должна быть промаркирована, иметь соответствующее направление, а вся партия - заполненный сопроводительный лист (*см. Приложение № 2*).

Во избежание инфицирования бланков направлений и сопроводительных документов желательно помещать их в чистый конверт или полиэтиленовый пакет и передавать непосредственно в руки водителю автотранспорта, не помещая их в транспортировочный контейнер.

Категорически запрещается заворачивать флакон с материалом в бланк направления. Это необходимо объяснить больному и работнику, ответственному за сбор и транспортировку материала.

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

При поступлении материала, не отвечающего вышеуказанным требованиям, а также при отсутствии направления и/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.

Вопрос доставки диагностического материала, и/или «мазков» решается в субъектах Российской Федерации в установленном порядке.

График работы сотрудников лаборатории должен предусматривать прием, регистрацию и немедленную обработку доставленного диагностического материала (мазков), 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 № 2 данной инструкции*);
- в сопроводительном листе должна быть указана дата, время отправки материала и подпись сотрудника, ответственного за отправку.

Сопроводительный лист составляется в 2 экземплярах: один заполненный экземпляр передается в лабораторию; другой – с подписью сотрудника, принявшего материал для исследования, возвращается в учреждение, направившее материал в лабораторию.

## **VIII. ПРАВИЛА РАБОТЫ С ДИАГНОСТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ**

### **8.1. Прием 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 фенола);

- аккуратно открыть крышку контейнера и проверить, нет ли на поверхности флаконов следов протечки материала. 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 желательно подвергнуть стерилизации в сухожаровом шкафу в течение 30 минут при 85°C.

## 8.2. Техника безопасности при работе с диагностическим материалом

Приготовление мазков для микроскопического исследования является весьма ответственной процедурой, во многом предопределяющей успех исследования. При этом необходимо иметь в виду, что это одна из самых эпидемически опасных процедур.

Возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* распространяется преимущественно воздушным путем в составе аэрозольных частиц. В процессе подготовки материала для исследования создается высокий риск образования аэрозолей с капельными ядрами диаметром от 1 до 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.

Для предупреждения случаев внутрилабораторного заражения необходимо свести к минимуму возможность образования аэрозолей. Для защиты лабораторных работников от инфицирующих частиц необходима хорошая вентиляция, защитная одежда, маски и неукоснительное соблюдение техники безопасности выполнения лабораторных процедур. Все меры безопасности должны быть направлены на то, чтобы избежать или свести к минимуму опасность заражения во время тех манипуляций, при выполнении которых наблюдается наибольшая возможность образования и рассеивания потенциально опасных инфекционных аэрозолей.

В лабораториях при микроскопическом исследовании основным источником образования инфекционных аэрозолей являются манипуляции по приготовлению мазков.

Оптимальным является приготовление мазков под вытяжкой или в боксе с наличием вытяжного устройства.

Аэрозоли могут образовываться в процессе следующих манипуляций:

- при открывании 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;
- при приготовлении мазков путем нанесения материала на предметное стекло и распределении его по поверхности стекла;
- при прожигании неочищенных от остатков материала бактериологических петель, которые используются для переноса материала на стекло и приготовления мазка;
- при попытках фиксировать над горелкой невысохший влажный мазок, что приводит к вскипанию и разбрызгиванию частичек материала;
- при незамеченном в процессе работы попадании капель материала на рабочую поверхность столов и отсутствии последующей дезинфекции рабочих поверхностей.

Выполнение всех перечисленных манипуляций требует соблюдения особой осторожности, так как они связаны с высоким риском образования инфекционных аэрозолей.

## 8.3. 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, что гораздо важнее количества собранной мокроты. Достаточно иметь 3-5 мл мокроты, но хорошие результаты исследования могут быть получены и при исследовании меньших объемов мокроты.

Индукцированная, 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, что материал был получен после аэрозольных ингаляций.

## IX. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ ДЛЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

На практике используются два метода микроскопического исследования:

- **метод прямой микроскопии**, когда мазок приготавливается непосредственно из необработанного диагностического материала или его осадка (жидкий материал);
- **метод микроскопии мазка из осадка материала**, подготовленного для культурального исследования путем обработки гомогенизирующими и обеззараживающими средствами и последующего центрифугирования.

Первый метод широко применяется в тех лабораториях, в которых производится только микроскопическое исследование (клинико-диагностические лаборатории общей лечебной сети) с последующей окраской по методу *Ziehl-Neelsen* и исследованием в световом микроскопе. Однако этот метод менее информативен, чем микроскопия осадка, так как при подготовке осадка происходит его «обогащение» за счет освобождения микробов из окружающей их слизи и осадения их 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. Поэтому окраску люминесцентными красителями рекомендуется применять преимущественно при исследовании мазков, приготовленных из осадка материала, обработанного детергентами или муколитическими средствами.

### 9.1. Оборудование и реактивы для приготовления мазков из диагностического материала при окраске по методу *Ziehl-Neelsen*

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 должны быть стандартизованными, а для максимальной безопасности все материалы и реактивы 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 бактериологическая петля 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, стеклянная банка) с отмытым речным песком, залитым техническим спиртом (70°), для очистки бактериологической петли от остатков материала перед очередной стерилизацией её в пламени горелки;
- спиртовка или газовая горелка Бунзена для прокаливания петли;
- одноразовые или стерильные стеклянные чашки Петри для отбора гнойных комочков мокроты (материала);
- стерильные пипетки на 10 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. При отсутствии в лаборатории автоклава для обеззараживания посуды и отработанного диагностического материала используются специальные баки, в которых обеззараживание осуществляется путем кипячения;
- 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.

### 9.2. 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 + эфир в соотношении 1:1) стекла без царапин и сколов. При повторном использовании стекла могут быть недостаточно хорошо отмыты от предыдущего материала, что может привести к получению ложноположительных результатов. Не рекомендуется использовать саморезанные стекла, которые приводят к значительным aberrациям исследуемого изображения. Стекла должны соответствовать ГОСТу.

Стекла, на которых при микроскопическом исследовании были обнаружены кислотоустойчивые микобактерии, сохраняются в

лаборатории в течение 1 года, а затем подлежат обязательному уничтожению и не должны использоваться повторно.

Новые предметные стекла кипятят 15 минут 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 в течение суток. Непосредственно перед приготовлением мазков стекла повторно протираются насухо.

### 9.3. Приготовление мазков из нативного материала

Как указывалось выше, мазок может быть приготовлен непосредственно из нативного (необработанного) материала или его осадка (при исследовании жидких материалов).

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

В случае окраски флуорохромными 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 аэрозольей.

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 его 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.

Использованные 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.

**Приготовления 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 и др.). 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. Приложение № 11 настоящего приказа).

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. Стекла готовят накануне их использования. Срок хранения не превышает 2-х суток.

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.

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 не окрашенный 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.

#### 9.4. 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 инфекции и возможность переноса ее насекомыми.

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.

## X. МЕТОДЫ ОКРАСКИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Для окраски мазков, приготовленных непосредственно из диагностического материала (метод прямой микроскопии), наиболее часто используется метод *Ziehl-Neelsen*. Однако при большом количестве исследуемых ежедневно мазков в целях ускорения процедуры микроскопии практикуется использование люминесцентной микроскопии.

### 10.1. Окраска препаратов для световой микроскопии

#### по методу *Ziehl-Neelsen*

Метод окраски по *Ziehl-Neelsen* является наиболее употребляемым и 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.

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

Для окраски мазков по методу Ziehl-Neelsen необходимы:

- раковина или специальный вместительный лоток для 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;
- металлический стержень для приготовления ватного тампона, 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 (карболовая кислота), 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.

### 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 полученного раствора фенола (2) добавить 10 мл насыщенного раствора фуксина (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 добавляют 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.

**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 используют 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 1 минуты, не превышая 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.

**10.3. 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 источником света (определенный спектр ультрафиолетового излучения) 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 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*.

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

Для окраски препаратов флюорохромными красителями необходимы:

- раковина или специальный вместилище 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;
- металлический стержень для приготовления ватного тампона, используемого вместо горелки для фиксации препарата перед окраской, 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 подогревать мазки и пользоваться фильтровальной бумагой.

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

Микроскопию производят по возможности сразу же после окончания процедуры окраски люминесцентными красителями и высыхания мазков. В случае невозможности проведения немедленной микроскопии окрашенные мазки рекомендуется сохранять, прикрыв черной бумагой во избежание ослабления флюоресценции.

При окраске мазков необходимо:

- избегать неполного обесцвечивания, т.к. кислотоустойчивые микобактерии практически не обесцвечиваются;
- 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:

#### 10.4.1. 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.

Предупреждение: 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:**

- стекла с фиксированными мазками раскладывают на специальные штативы «рельсы» для окраски так, чтобы они не касались друг друга;

- мазки заливают раствором 1 на 1 час;

Предупреждение: нельзя нагревать мазки и использовать полоски фильтровальной бумаги.

- тщательно, но аккуратно промывают мазки дистиллированной водой;

- обесцвечивают раствором 2 (солянокислый спирт) в течение 3 минут;

- промывают дистиллированной водой;

- гашение фона осуществляют раствором 3 в течение 1 минуты.

Если препарат имеет интенсивную синюю окраску, можно очень аккуратно повторно промыть его дистиллированной водой;

- мазки высушивают при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.

#### 10.4.2. Метод окраски аурамином О

##### **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.І.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 96°	10 мл

Растворить аурамин в спирте.

**Раствор 2.** Раствор фенола:

Фенол кристаллический	3,0 г
Дистиллированная вода	87 мл

Расплавить кристаллы фенола (температура плавления 41°С) и растворить его 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. 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 70° этиловому спирту.	

**Растворы 4.** Гасители фона:

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

а) Раствор перманганата калия:

Перманганат калия ( $\text{KMnO}_4$ )	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, дату приготовления и срок годности. Готовый раствор может храниться при комнатной температуре в течение 3 месяцев.

б) Раствор акридинового оранжевого:

Безводный двузамещенный фосфат натрия ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	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:**

- стекла с фиксированными мазками раскладывают на специальные штативы «рельсы» для окраски так, чтобы они не касались друг друга;
- мазки заливают раствором аурамина О на 15 минут;
- тщательно, но аккуратно промывают мазки дистиллированной водой;
- обесцвечивают раствором 3 (0,5 % раствор солянокислого спирта) в течение 2 минут;
- промывают дистиллированной водой каждое стекло до тех пор, пока не смоются все остатки краски;
- 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;

- мазки промывают дистиллированной водой;
- мазки высушивают при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.

Нельзя нагревать мазки и использовать полоски фильтровальной бумаги.

#### 10.4.3. 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 больной находится это время в стационаре. Окрашенные флуоресцентными красителями мазки чувствительны к ультрафиолетовому свету, особенно во время процесса бактериоскопии, и способны за несколько секунд обесцветиться. Для исключения этого мазки просматривают достаточно быстро, а при необходимости сделать пузу, перекрывают поток света от лампы шторкой. Обесцветившиеся мазки можно повторно окрасить, однако это не всегда приводит к полному восстановлению препарата.

## XI. ТЕХНИКА МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТА

### 11.1. 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;
- каплеуловитель 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.

### 11. 2. 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 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.

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.

### 11.3. 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 быть расположены в порядке номеров регистрации;
- коробки для хранения просмотренных мазков;
- мягкая хлопчатобумажная ткань или марлевые 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.

### 11.4. 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, используя рекомендации по настройке и эксплуатации микроскопа (*Приложением №3 настоящей инструкции*). Несоблюдение правил настройки может привести к существенному снижению эффективности микроскопических исследований.

Исследование мазков, окрашенных по методу *Ziehl-Neelsen*, производится в проходящем свете с помощью светового микроскопа. Исследование рекомендуется производить с помощью бинокулярного микроскопа или монокулярного микроскопа, оснащенного бинокулярной насадкой.

При исследовании мазков, окрашенных флуоресцентными красителями, используется люминесцентный микроскоп. При этом одной из важных особенностей работы с мазками, окрашенными флюорохромами, является то, что они не подлежат длительному наблюдению в выбранном поле зрения, так как интенсивность люминесценции окрашенного объекта быстро снижается. Другой особенностью работы является необходимость строгого соблюдения режима работы люминесцентного микроскопа:

Ртутную лампу нельзя включать ранее, чем через 15 минут после ее зажигания. Повторное включение ртутной лампы допускается только через 10 минут после ее выключения (полного ее охлаждения).

Для предохранения препаратов от выцветания в перерывах между наблюдениями необходимо закрывать лампу шторкой.

Перед началом микроскопического исследования 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;
- с помощью бумажной салфетки или марлевого тампона, смоченного спирто-эфирной смесью, протереть линзы объективов микроскопа;
- убедиться в том, что подготовленные для микроскопии окрашенные препараты достаточно хорошо высушены;
- с помощью вращения винта грубой фокусировки (макровинта) 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 так, 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 или препаратоводителя;
- с помощью винтов препаратоводителя выбрать участок мазка для начала 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 используют регулятор накала лампы, темные или матовые фильтры и лишь в крайнем случае изменяют степень открытия диафрагмы. Положение конденсора не изменяют;
- продолжая смотреть через окуляр, медленно повернуть макровинт, чтобы предметный столик отошел от линзы объектива. Обычно для получения изображения достаточно несколько 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 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.

Для исследования объекта с большим увеличением с помощью «сухой» оптической системы, глядя на препарат сбоку, выбрать объектив с более сильным увеличением. Убедиться, что этот объектив не касается предметного стекла, и поворотом револьверного устройства переместить выбранный объектив, установив его 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 таким образом, чтобы поле зрения под объективом было прозрачным.

#### ***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 револьверного устройства сместить сухой объектив 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. Это может привести к переносу микобактерий с одного мазка на другой, к загрязнению иммерсионного масла и получению ложноположительного результата микроскопического исследования;

- поворотом головки револьверного устройства установить объектив с сильным увеличением (90х – 100х) непосредственно над препаратом.

- глядя сбоку, под контролем глаза медленно вращать макровинт грубой фокусировки и поднимать столик микроскопа до появления мениска в момент соприкосновения фронтальной линзы объектива с поверхностью капли масла.

- глядя в окуляр, с помощью винтов грубой и тонкой 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, предварительно удалив масло с объектива.

При микроскопическом исследовании мазка, окрашенного по *Ziehl-Neelsen*, следует просматривать не менее 100 полей зрения, чтобы дать количественную оценку препарату и обнаружить единичные микобактерии. В том случае, если результат такого исследования оказывается отрицательным, для подтверждения просматривают дополнительно 200 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 2).

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.

Просматривать препарат 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 можно просматривать меньшее число полей зрения. Однако при отрицательном результате или малом количестве выявляемых микобактерий следует просматривать не менее 100 полей зрения.

По окончании микроскопического исследования каждого препарата следует:

- освободить препарат от механических держателей – клемм или 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 или толуола;
- 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 выстланных 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.

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.

## **ХП. ПРИЧИНЫ ОШИБОК ПРИ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

### **12.1. Ошибки при выполнении лабораторных процедур**

#### *12.1.1. Ложноположительные результаты 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 петлей, пипеток или деревянных палочек;

— применение предметных стекол с царапинами и другими дефектами, в результате чего появляются артефакты, которые ошибочно могут быть приняты за микобактерии; красная краска может

иногда задерживаться на царапинах и создавать у начинающего исследователя ошибочное представление о том, что он видит кислотоустойчивую микобактерию. Такие царапины нередко образуют параллельные ряды. Обычно они более грубые и больше по размерам, чем микобактерии. Их несложно идентифицировать, 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 сохранившегося раствора фуксина, содержащего кристаллы;

— 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.

#### *12.1.2. Ложноотрицательные результаты могут быть обусловлены следующими причинами:*

— плохим качеством или недостаточным количеством исследуемого материала;

— исследованием слюны вместо мокроты;

— неудачным выбором частиц мокроты для приготовления мазка;

— 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);

— 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;

— 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;

— хранение окрашенных мазков в месте, доступном прямым солнечным лучам или ультрафиолетовому свету, парам кислот.

Мазки, окрашенные флуорохромами, при длительном хранении могут утрачивать флуоресценцию.

#### *12.1.3. 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 1

#### **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	Возможно, 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	Возможно, поверхности линз загрязнены маслом или загрязнены. Возможно повреждение линз.	Очистить линзы.  Заменить поврежденные линзы.

### ХIII. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 13.1. 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 обязательно и количественным. При использовании объектива 90х или 100х и окуляра 7х -10х (общее увеличение = 630 – 1000 х) используется следующая градация результатов световой иммерсионной микроскопии (см. Таблицу 2).

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 2.

#### 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 КУМ

\*\*Соответствие градаций:

Точное число	- Единичные КУМ в препарате;
1+	- Единичные КУМ в поле зрения;
2+	- Умеренное количество КУМ;
3+	- Значительное количество КУМ;

#### 13.2. 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 3).

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

Таблица 3.

**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 на 1 поле зрения	2 +			
> 10 на 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.

Лабораторный журнал 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.

#### **XIV. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ КИСЛОУСТОЙЧИВЫХ 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:

- а) внутрилабораторный контроль качества выполняемых исследований;
- б) 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.

#### 14.1. Внутрिलाбораторное обеспечение качества микроскопических исследований

Важным элементом обеспечения качества выполняемых исследований является регулярное осуществление внутрिलाбораторного контроля качества микроскопических исследований, который достигается систематическим наблюдением за проводимой в лаборатории работой и оценкой ее эффективности.

Контроль качества осуществляется на всех технологических этапах микроскопического исследования и включает:

- оценку качества поступающих проб;
- контроль за соблюдением рецептуры и методики приготовления реагентов и красителей;
- наблюдение за соблюдением методических приемов при:
  - а) приготовлении мазков (включая качество предметных стекол);
  - б) окраске мазков;
  - в) проведении микроскопического исследования;
  - г) учете и регистрации результатов.

Кроме того, элементами внутрिलाбораторного контроля качества является проверка правильности:

- организации рабочих мест (приема и регистрации материала, приготовления и окраски мазков, микроскопирования);
- соблюдения правил и сроков хранения реагентов и красителей;
- 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;
- регулярным 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 мазков, 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.

Качество исследований обеспечивается всеми сотрудниками лаборатории.

#### 14.2. 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 клиничко-диагностические и бактериологические лаборатории путем заочной оценки качества с использованием контрольных образцов.

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 видов деятельности клиничко-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 Минздрава России федеральная и региональные бактериологические референс-лаборатории.

#### 14.3. 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.

#### 14.4. Инспекционный контроль качества микроскопических исследований

Инспекционный контроль (кураторские визиты) имеет целью проведение текущей оценки основных показателей работы лаборатории и проверку достоверности получаемых в ней результатов микроскопического исследования путем очной проверки деятельности лаборатории при ее посещении представителями лицензирующего органа и курирующей лаборатории.

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

#### 14.5. Организация и управление работой лаборатории

В связи с высокой трансмиссивностью микобактерий туберкулеза и, как следствие, с высоким риском заболевания среди сотрудников лабораторных 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) 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 эффективных устройств обеззараживания воздуха и др.);
- в) меры персональной защиты органов дыхания персонала (защитные маски, респираторы).

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 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.

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.

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 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.

#### *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

---

<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".

Целый ряд распространенных дезинфектантов обладают незначительной или не обладают вовсе микобактерицидной активностью, а средства на основе четвертичного аммония неэффективны в рекомендуемых концентрациях. Слабые водные растворы перекиси водорода также не оказывают дезинфицирующего действия.

консервируется до прихода специалиста по ремонту и эксплуатации данного прибора.

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

Микроскопическое исследование производится только при наличии письменного направления на исследование от уполномоченных лиц.

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 разделить 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 помечать и немедленно удалять 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. Они 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.

Окрашенные для исследования мазки не пригодны, если при окраске флюорохромными красителями:

- в положительном контрольном мазке не обнаруживаются ярко окрашенные бактериальные клетки или они имеют тусклую флюоресценцию;
- отрицательные контрольные мазки содержат флюоресцирующие объекты;
- фон недостаточно темный 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 полученные данные для ведения статистики исследований.

Приложение №1  
к Инструкции по унифицированным методам  
микроскопических исследований  
для выявления кислотоустойчивых  
микобактерий в клинико-диагностических  
лабораториях лечебно-профилактических  
учреждений

### РЕКОМЕНДУЕМЫЙ СПИСОК ОБОРУДОВАНИЯ И РЕАКТИВОВ ДЛЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Основное оборудование:
  - микроскоп бинокулярный световой ГОСТ 15150-69;
  - микроскоп люминесцентный ГОСТ 15150-69;
  - спиртовка со стеклянным колпачком или горелка Бунзена;
  - баллон с бутаном;
  - облучатель бактерицидный потолочный;
  - аквадистиллятор;
  - стерилизатор паровой вертикальный для обеззараживания патологического материала и изделий медицинского назначения с объемом камеры 30 - 75 л - ТУ 9451-080-12517820-96;
  - вытяжной шкаф лабораторный;
  - весы для химических реактивов с точностью до 0,01 г - ГОСТ 24104-80;
2. Дополнительное оборудование и расходные материалы:
  - капельница для нанесения иммерсионного масла на препарат;
  - петля бактериологическая нихромовая с петледержателем;
  - подставка («рельсы») для фиксации и окраски мазков;
  - лотки (подносы) для сушки неокрашенных мазков;
  - штативы для сушки мазков в вертикальном или наклонном положении;
  - емкость с отмытым речным песком и 70° спиртом для очистки бактериологических петель;
  - коробки для хранения стекол, картонные или металлические, на 12 - 25 стекол;
  - таймер на 0 - 60 минут;
  - пинцеты анатомические или щипцы для взятия предметных стекол;
  - ножницы из нержавеющей стали;
  - градуированные цилиндры;
  - фарфоровые ступки с пестиками;
  - колбы разной емкости;
  - пипетки на 1, 2, 5, 10 мл;
  - темные флаконы стеклянные или пластиковые для хранения красителей;
  - флаконы с капельными дозирующими трубками для нанесения красителей на препарат;

- флаконы для сбора проб диагностического материала;
  - контейнеры (транспортные ящики) для транспортировки проб;
  - планшеты для транспортировки мазков;
  - чашки Петри одноразовые пластиковые диаметром 90 мм;
  - предметные (оптические препаративные) стекла 25 мм х 75 мм, толщиной 1,1-1,3 мм-ГОСТ 9284-75;
  - масло иммерсионное - ГОСТ 13739-78 – с показателем преломления =1,515;
  - штативы для предметных стекол, на 12 - 25 стекол;
  - контейнер для отработанных заразных материалов;
  - контейнер пластмассовый для бумажного мусора;
  - вата белая гигроскопическая или марлевые салфетки;
  - одноразовые перчатки;
  - лабораторные халаты;
  - маски;
  - бумажные полотенца, одноразовые;
  - ручки, шариковые, с красными чернилами;
  - ручки, шариковые, с черными или синими чернилами;
  - восковой карандаш или несмываемый маркер;
  - фильтровальная бумага № 1;
  - ткань для протирания линз;
  - бланки направления на микроскопическое исследование;
  - лабораторный журнал;
  - лабораторные бланки для ответов.
3. Реактивы:
    - 3.1. Растворители, кислоты:
      - спирт этиловый 96° марки ОП-2;
      - кислота соляная концентрированная - ГОСТ 3118 - 77;
      - кислота серная концентрированная - ГОСТ 4204 - 77;
      - вода дистиллированная - ГОСТ 6709-72;
      - ксилол - ГОСТ 25828-83;
      - бумага индикаторная универсальная - ТУ 6 – 09 – 1181 – 76;
    - 3.2. Соли, красители:
      - фуксин основной ТУ 6-093804-74;
      - фенол кристаллический (карболовая кислота) – ГОСТ 6417-72;
      - метиленовый синий хлорид - ТУ 6-09945-75;
      - глицерин - чда - ГОСТ 6259-75;
      - аурамин ОО (аурамин О, Sigma);
      - родамин С – ТУ 6-09-2463-77;
      - акридиновый оранжевый С.И. 46005;
      - перманганат калия - ГОСТ 10163-76.
    - 3.3. Растворы дезинфицирующих средств:
      - 5% раствор хлорамина или
      - 5% раствор фенола или
      - 5% раствор гипохлорита.

Приложение № 2  
к Инструкции по унифицированным методам  
микроскопических исследований  
для выявления кислотоустойчивых  
микобактерий в клинико-диагностических  
лабораториях лечебно-профилактических  
учреждений

Сопроводительный лист при транспортировке  
диагностического материала в микроскопическую лабораторию

(заполняется в 2-х экземплярах)

Учреждение отправитель \_\_\_\_\_

Адрес \_\_\_\_\_ тел: \_\_\_\_\_

Учреждение получатель \_\_\_\_\_

Адрес \_\_\_\_\_ тел: \_\_\_\_\_

№ п/п	Фамилия, имя, отчество пациента	Материал	Дата сбора	Примечание
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				
11.				
12.				

Итого: \_\_\_\_\_

Подпись ответственного лица: \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_\_)

Дата и время отправления материала: \_\_\_\_\_

Материал сдал: \_\_\_\_\_ Материал принял: \_\_\_\_\_

Дата и время получения материала \_\_\_\_\_

Приложение № 3  
к Инструкции по унифицированным методам  
микроскопических исследований  
для выявления кислотоустойчивых  
микобактерий в клинико-диагностических  
лабораториях лечебно-профилактических  
учреждений

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАСТРОЙКЕ И ЭКСПЛУАТАЦИИ  
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 необходимо 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 расположенных сбоку от конденсора его 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 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.

Правила эксплуатации микроскопа.

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

Повышенная влажность воздуха помещения, в котором находится микроскоп, 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 сухим силикагелем (имеет голубой цвет). Когда силикагель насытится влагой и не сможет более абсорбировать воду, 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 используется ватный тампон, смоченный в растворе противогрибкового препарата. Этим тампоном круговыми движениями аккуратно протирают загрязненные линзы. При необходимости такую обработку можно повторить, а затем насухо протереть линзы специальной мягкой тканью.

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

При переносе микроскопа следует держать его двумя руками — за штатив и за основание. Нельзя переносить микроскоп, держа его только

одной рукой. Следует избегать необоснованно частых перемещений 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 протираются только *специальной мягкой тканью для линз или марлевой салфеткой*. Окуляры наиболее чувствительны к неправильному обращению. Они должны чиститься мягкой кистью или струей сухого воздуха (от небольшой груши). Нельзя использовать растворители для очистки линз окуляров.

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 никогда 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 сохранения 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;

- сухим ватным тампоном одним движением руки снять иммерсионное масло с передней линзы объектива;
- смочить следующий сухой тампон в смеси спирта и эфира с таким расчетом, чтобы он был слегка увлажненным;
- круговым движением, не вдавливая линзу внутрь объектива (конденсора), аккуратно протереть ее;
- 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 количеством увлажняющей тампон смеси; тампон должен быть слегка увлажненным.

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.