

Методики лабораторных исследований

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКОБАКТЕРИЙ МЕТОДОМ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ. ЧАСТЬ 2. МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ

© 2019 г. Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Андриевская И.Ю., Смирнова Т.Г.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Поступила: 20.09.2019

Изложен метод выявления микобактерий (МБ) с помощью микроскопического исследования препаратов, окрашенных люминесцентными красителями. Описаны порядок подготовки люминесцентного микроскопа к работе и техника микроскопического исследования препарата. Предложена методика количественного учета результатов микроскопического исследования, основанная на исследовании стандартной площади препарата. Показано, что количество просматриваемых полей зрения варьируется в зависимости от используемого увеличения конкретного люминесцентного микроскопа. Даны рекомендации по количеству полей зрения, просмотр которых обеспечивает исследование требуемой площади препарата при использовании различных увеличений люминесцентного микроскопа.

Ключевые слова: микобактерии, метод люминесцентной микроскопии.

DOI: 10.7868/52587667819040101

Laboratory Techniques

DETECTION OF MYCOBACTERIA BY LUMINESCENCE MICROSCOPY PART 2. MICROSCOPIC STUDY OF SMEARS

Sevastyanova E.V., Larionova E.E., Andrievskaya I.Yu., Smirnova T.G.

Central TB Research Institute, Moscow, Russia

Submitted as of 20.09.2019

We have described the microscopic detection of mycobacteria using luminescence staining of smears. We described the preparation procedures for a luminescence microscope and the techniques of microscopic examination. We proposed a method of quantitative recording of microscopic examination results based on the standard smear area. It was demonstrated that the number of examined visual fields varied depending on the magnification of a microscope. The numbers of visual fields, which provided the optimal smear area under different magnifications, were recommended.

Keywords: mycobacteria, luminescence microscopy.

Оборудование и реактивы для проведения микроскопического исследования препаратов, окрашенных флуорохромными красителями

Образец организации рабочего места для микроскопического исследования препаратов люминесцентным методом представлен на рисунке.

Для проведения микроскопического исследования при окраске флуорохромами необходимо:

- люминесцентный микроскоп;
- штатив с окрашенными и высушенными препаратами, которые должны быть расположены в порядке номеров регистрации;
- коробки для хранения просмотренных препаратов;
- емкость с 96% спиртом;
- мягкая хлопчатобумажная ткань или специальные салфетки для протирания линз микроскопа;
- бумага и ручка для записи результатов микроскопического исследования;
- емкость с дезинфицирующим средством.



Рисунок. Рабочее место микроскописта.
Figure. The workplace of a microscopist.

Для исследования препаратов, окрашенных флуорохромными красителями, используют люминесцентный микроскоп со стандартным набором объективов и окуляров, предназначенных для люминесцентной микроскопии и позволяющих получить увеличение объекта наблюдения в пределах $200\times$ – $630\times$.

Практические рекомендации по люминесцентной микроскопии

- Рабочее помещение: при слабой люминесценции лучше всего работать в затемненном помещении. Во время работы не следует выходить в светлые помещения, смотреть на свет лампы или на светлые окна. Температура в помещении не должна быть выше $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Микроскоп с ртутной лампой должен быть установлен на столе и удален от стен на расстояние не менее 30–50 см, при этом над микроскопом могут находиться полки, но не ниже, чем на 1,0 м от микроскопа.
- Выцветание препаратов: если препарат не наблюдается и не фотографируется, то следует перекрыть свет возбуждения подвижной со светофильтром в люминесцентном

осветителе, чтобы предотвратить выцветание препарата.

- Иммерсионная жидкость, не обладающая люминесценцией: при использовании иммерсионных сред, обладающих собственной люминесценцией, фон становится светлее, что приводит к ухудшению контраста.
- Теплозащитный светофильтр: люминесцентные светофильтры чувствительны относительно исходящего от лампы теплового излучения. Поэтому ни в коем случае нельзя устранять встроенный тепловой светофильтр.
- Юстировка лампы: время от времени, но обязательно каждый раз после замены лампы, необходимо дополнительно юстировать лампу. В этих целях рекомендуется пользоваться инструкцией по обслуживанию и не забывать о мерах безопасности.

Порядок подготовки микроскопа и проведения микроскопического исследования препаратов

Порядок подготовки микроскопа к работе

Перед началом работы люминесцентный микроскоп должен быть в рабочем состоянии.

Ремонт, профилактические осмотры и настройка микроскопа должны проводиться представителями сервисной технической службы не реже 1 раза в полгода. Несоблюдение правил настройки может привести к существенному снижению эффективности микроскопических исследований.

Одной из важных особенностей работы с препаратами, окрашенными флуорохромами, является то, что они не подлежат длительному наблюдению в выбранном поле зрения, так как интенсивность люминесцентного свечения окрашенного объекта быстро снижается и приводит к постепенному изменению яркости, а также цвета вплоть до полного исчезновения светящейся метки.

Другой особенностью работы является необходимость строгого соблюдения режима работы люминесцентного микроскопа.

- Ртутную лампу нельзя выключать ранее, чем через 5 минут после ее поджига. Повторное включение ртутной лампы допускается только через 10–20 минут после ее выключения (полного охлаждения).
- Для предохранения препаратов от выцветания в перерывах между наблюдениями необходимо закрывать лампу шторкой.

Реальный срок работы ртутной лампы не превышает 100–400 часов (в зависимости от мощности лампы), по истечении указанного срока трудно получить достаточное свечение объектов. Поэтому рабочий день должен быть построен так, чтобы максимально эффективно использовать время работы микроскопа. Целесообразно вести журнал, где следует учитывать время работы лампы (в часах).

Перед началом исследования следует:

- проверить наличие на столе для микроскопии необходимого для проведения микроскопического исследования оборудования и дополнительных материалов;
- снять полиэтиленовый или пластиковый чехол, которым накрыт микроскоп;
- осмотреть микроскоп и протереть сухой салфеткой части микроскопа: механические (предметный стол) и оптические (глазную линзу окуляров);
- убедиться в целостности оптической системы осветителя и наличии необходимого комплекта светофильтров, соответствующих конструкции люминесцентного микроскопа и установленных в определенном ею порядке;

– убедиться, что все диафрагмы люминесцентного осветителя (полевая и апертурная) открыты;

– убедиться, что окулярные трубки биноклярной насадки раздвинуты по индивидуальной глазной базе, и что диоптрийная наводка на окулярной трубке или окуляре с маркировкой «ГОС» установлена в соответствии с индивидуальной настройкой для соответствующего глаза (чаще всего левого);

– с помощью специальной салфетки для линз или мягкой фланелевой ткани, **чуть** смоченной спиртом, протереть первую линзу рабочих объективов микроскопа;

– закрыть шторку, опустить защитный экран, включить блок поджига ртутной лампы, в соответствии с инструкцией по эксплуатации дать прогреться ртутной лампе 10–12 минут;

– положить на предметный столик белый лист бумаги или белую окрашенную пластину, установить в ход лучей пустое гнездо (гнездо без объектива), открыть шторку и, глядя через защитный экран, убедиться, что светящееся тело ртутной лампы равномерно заполняет круг или яркий сдвоенный контур находится в его центре; закрыть шторку;

– убедиться в том, что подготовленные для микроскопии окрашенные препараты достаточно хорошо высушены и расставлены в штативе в порядке регистрационных номеров; что они не имеют на обратной стороне следов краски;

– с помощью вращения винта грубой фокусировки (макровинта) опустить предметный столик, отдалив его от объектива;

– поворотом револьверного устройства установить в ход лучей объектив с малым увеличением (8× или 10×);

– поместить на столик предметное стекло, на котором расположен контрольный препарат таким образом, чтобы препарат находился прямо под объективом; при этом **обязательно убедиться, что препарат находится на верхней поверхности предметного стекла**, а не снизу;

– закрепить препарат на столике с помощью клемм или откидной лапки препаратоводителя;

– с помощью рукояток перемещения препаратоводителя выбрать участок препарата для начала просмотра, – для люминесцентного микроскопа это может быть край препарата или предметного стекла (при настройке в поле зрения должна быть видна пограничная зона);

– медленно вращая винт грубой фокусировки (макрвинт) и контролируя взглядом сбоку рас-

стояние между предметным стеклом и нижним краем объектива, поднять предметный столик, оставляя между препаратом и объективом расстояние приблизительно 2–3 мм. **Не допускать соприкосновения предметного стекла с линзой объектива!**

- открыть шторку осветителя;
- глядя в окуляры, **медленно** вращать макровинт так, чтобы предметный столик начал опускаться от края объектива; вращать до тех пор, пока не появится изображение препарата (на черном или зеленоватом фоне контур края препарата или предметного стекла). Обычно для получения изображения достаточно несколько поворотов винта; расстояние до указанных объективов составляет, как правило, 4–5 мм;
- глядя в окуляры, **медленно и в ту же сторону** вращать микровинт до тех пор, пока не появится изображение препарата. Небольшими поворотами микровинта получить резкое изображение;
- глядя правым глазом в правый окуляр, проверить резкость изображения препарата;
- глядя левым глазом в левый окуляр, проверить резкость изображения препарата; если видно не резко, то с помощью диоптрийной наводки, расположенной на окулярной трубке или в окуляре с маркировкой «фоc», получить резкое изображение для левого глаза.

Никогда не поднимайте столик микроскопа, глядя в окуляр. Это может привести к соприкосновению фронтальной линзы окуляра с предметным стеклом, к повреждению линзы или порче препарата.

Для исследования препарата с помощью «сухого» объектива большего увеличения:

- глядя на револьверное устройство для крепления объективов сбоку, выбрать объектив с большим увеличением;
- поворотом револьверного устройства **медленно и аккуратно** установить объектив в рабочее положение;
- убедиться, что объектив не касается предметного стекла;
- с помощью микровинта получить увеличенное резкое изображение пограничной полосы препарата или предметного стекла.

Все манипуляции по смене объективов проводятся при сфокусированном микроскопе. При настройке объект исследования должен быть выведен из поля зрения, чтобы не засвечивать флуорохромные метки.

Порядок проведения микроскопического исследования препаратов

В препаратах, окрашенных флуорохромными красителями, интенсивность люминесценции окрашенного объекта сравнительно быстро снижается. Поэтому обычно **окрашенные флуорохромными красителями препараты не подлежат длительному хранению на свету**. По возможности, микроскопическое исследование приготовленных препаратов рекомендуется проводить сразу же после окончания процедуры окрашивания люминесцентными красителями и высыхания препаратов.

Окрашенные флуоресцентными красителями препараты особенно чувствительны к ультрафиолетовой части светового спектра во время процесса бактериоскопии и способны быстро обесцветиться. Для предотвращения этого препараты просматривают достаточно быстро, а при необходимости сделать паузу – перекрывают поток света шторкой. Обесцветившиеся препараты можно повторно окрасить, однако это не всегда приводит к полному восстановлению качества окраски препарата.

Просмотр препаратов должен начинаться с просмотра положительного и отрицательного контрольных препаратов!

При окраске флуорохромными красителями контроль не выдержан в следующих случаях:

- **отрицательные контрольные препараты дают флуоресцирующее свечение;**
- **положительные контрольные препараты не светятся или дают тусклую флуоресценцию;**
- **фон недостаточно обесцветился или имеет флуоресцентное свечение.**

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 параллельные проходы по длине препарата,
- либо параллельные проходы по ширине.

Исследовать препарат начинают с поля зрения, выбранного в левом верхнем участке препарата, постепенно передвигаясь либо вдоль продольной оси препарата до конца препарата, либо смещаясь вниз и затем вновь поднимаясь вверх и т.д., проходя все поля зрения до границы препарата.

Современные микроскопы комплектуются объективами с увеличением 20×, 40×, 63×, 100× и окулярами с увеличением 10× (линейные поля окуляров равны 18 мм и 20 мм), увеличение насадок составляет 1×. В табл. 1 представлены расчеты площадей и количества просматриваемых полей зрения препарата в зависимости от используемого в соответствии с современными стандартами увеличения микроскопа.

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что за счет использования меньших увеличений микроскопа, при люминесцентной микроскопии размер поля зрения больше, чем при наблюдении в проходящем свете на обычном микроскопе. Следовательно, одинаковая площадь препарата на люминесцентном микроскопе будет просмотрена быстрее, чем на обычном. В связи с этим, при исследовании препарата люминесцентным методом можно просматривать меньшее число полей зрения, чем при микроскопии в проходящем свете. Количество полей зрения, рекомендуемых для просмотра, зависит от используемого увеличения микроскопа.

В отечественной практике обычно используется следующая методика исследования препарата люминесцентным методом. Для выдачи отрицательного результата исследования или выявления единичных МБ, как правило, препарат просматривают от одного края до другого края, выполняя при этом один или два параллельных прохода по препарату (в зависимости от размера мазка и используемого увеличения микроскопа).

Например, если препарат имеет стандартный размер 2 см×1 см, то при использовании увеличения 400× (объектив 40×, окуляр 10×/18, насадка 1×) рекомендуется выполнить, как минимум, один просмотр вдоль препарата (по длине маз-

ка, которая равна 20 мм) либо 2 просмотра поперек препарата (по ширине мазка, которая равна 10 мм). Таким образом, общая длина просмотренного препарата должна составить примерно 20 мм, что включает в себя около 45 полей зрения (диаметр одного поля зрения – 0,45 мм). При этом будет просмотрена площадь препарата, равная 7,16 мм², что составляет 3,6% от общей площади препарата и вполне достаточно для выдачи отрицательного ответа.

При наличии в препарате значительного количества МБ, допускается просматривать меньшее количество полей зрения (как правило, достаточно исследовать от 10 до 20 полей зрения).

По окончании микроскопического исследования каждого препарата следует:

- освободить препарат от препаратоводителя;
- сверить идентификационный номер и записать результат на специальном листе бумаги с предварительно нанесенными порядковыми номерами препаратов;
- поместить препарат в специальную коробку, чтобы затем иметь возможность выбрать препараты для повторного просмотра.

По окончании микроскопического исследования всей партии препаратов необходимо выполнить следующие процедуры:

- с помощью специальной салфетки или фланелевой ткани протереть фронтальную линзу рабочих объективов микроскопа спиртом;
- опустить предметный столик микроскопа, отдалив его от объективов;
- выключить блок поджига ртутной лампы;
- через 10–15 минут (после того, как ртутная лампа остынет!) закрыть микроскоп чехлом;

Таблица 1. Площадь одного поля зрения, количество просматриваемых полей зрения и общая площадь просмотренного препарата в зависимости от увеличения микроскопа

Table 1. The area of a visual field, the number of examined visual fields and the total area of the examined sample depending on microscopic magnification

Общее увеличение	1000×		630×		400×		200×	
	18	20	18	20	18	20	18	20
Увеличение объектива	100×		63×		40×		20×	
Увеличение окуляра	10×		10×		10×		10×	
Увеличение насадки	1×		1×		1×		1×	
Диаметр поля зрения на препарате, мм	0,18	0,20	0,29	0,32	0,45	0,50	0,90	1,0
Площадь одного поля зрения, мм ²	0,025	0,031	0,066	0,080	0,159	0,196	0,636	0,785
Количество полей зрения	300	242	115	95	47	38	12	10
Площадь препарата по кол-ву полей, мм ²	7,50	7,50	7,59	7,60	7,47	7,45	7,63	7,85

- 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 с листа в лабораторный регистрационный журнал и на бланки ответов, предварительно заполненные до начала микроскопии.

Учет результатов микроскопического исследования при окраске препаратов флуорохромными красителями

Как уже указывалось ранее, препараты, окрашенные флуорохромными красителями, обычно просматривают под увеличением в пределах $200\times$ – $630\times$ (чаще всего используется увеличение $400\times$). Это значительно меньше, чем увеличение, используемое для просмотра препаратов, окрашенных карболовым фуксином ($1000\times$). В силу этого поле зрения, просматриваемое на люминесцентном микроскопе, имеет значительно большую площадь, чем поле зрения под объективом обычного микроскопа (табл. 1).

В связи с этим, при микроскопическом исследовании на люминесцентном микроскопе препарата, окрашенного флуорохромами, допускается просматривать меньшее количество полей зрения, чем при исследовании этого же препарата, окрашенного карболовым фуксином, на обычном микроскопе.

Выполненные расчеты показали, что площадь одного поля зрения и количество просматриваемых полей зрения существенно зависят от используемого увеличения конкретного люминесцентного микроскопа (табл. 1). Исходя из этого, с целью стандартизации метода люминесцентной микроскопии и для получения сравнимых количественных результатов исследования при использовании различных увеличений люминесцентного микроскопа, предложена модификация существующей техники просмотра препаратов и процедуры оценки полученных результатов люминесцентным методом.

В качестве альтернативы используемой в настоящее время методики [1] разработан способ, исключающий деление полученных количественных результатов на 2–10 (так называемый «фактор увеличения»), как это регламентировано Приказом МЗ РФ от 21 марта 2003 г. № 109. Вместо этого рекомендуется просматривать на люминесцентном микроскопе площадь препарата, равную 7–8 мм², что аналогично площади, просматриваемой при использовании метода

Циля–Нильсена. В этом случае, вне зависимости от используемых увеличений микроскопа, будут получены сравнимые результаты микроскопического исследования.

Для применения предлагаемого способа в практической работе, определены количества полей зрения, просмотр которых обеспечивает исследование требуемой площади препарата при использовании различных увеличений люминесцентного микроскопа, и разработана техника просмотра препарата. В табл. 2 представлено рекомендуемое к просмотру число полей зрения для оценки препарата как отрицательного при использовании различных увеличений микроскопа.

Таким образом, при отрицательном результате или малом количестве выявляемых МБ рекомендуется просматривать на люминесцентном микроскопе площадь препарата, равную приблизительно 7–8 мм², что составляет около 3,5–4% от общей площади приготовленного препарата. При этом количество просматриваемых полей зрения зависит от используемого увеличения люминесцентного микроскопа (для стандартного препарата размером 2 см × 1 см, как правило, требуется выполнить 1–2 параллельных просмотра по длине препарата, от одного края до другого края).

При значительном количестве МБ, обнаруживаемых в препарате, минимальное число полей зрения, обязательных для исследования люминесцентным методом, уменьшают (аналогично методу Циля–Нильсена). Так, при наличии в каждом поле зрения от 1 до 10 КУМ, достаточно исследовать от 10 до 20 полей зрения (в зависимости от используемого увеличения микроскопа), при наличии в каждом поле зрения более 10 КУМ, допускается просмотреть 5–10 полей зрения.

Учет результатов микроскопического исследования при окраске препаратов флуорохромными красителями и люминесцентной микроскопии проводится так же, как и при световой микроскопии препаратов, окрашенных по Цилю–Нильсену (табл. 3).

Таким образом, разработанный способ микроскопического исследования позволяет стандартизировать процесс просмотра препаратов и проводить адекватный количественный учет результатов микроскопии люминесцентным методом, а также достоверно сравнивать результаты, полученные с помощью различных методов микроскопического исследования.

Рекомендуемая для использования модифицированная методика микроскопического исследования препаратов люминесцентным методом изложена в разработанном нами учебном пособии «Люминесцентная микроскопия», которому присвоен гриф УМО РФ [2].

Таблица 2. Рекомендуемое число просматриваемых полей зрения для оценки препарата как отрицательного при различных увеличениях микроскопа

Table 2. The recommended number of examined visual fields to assess a sample as negative under different microscopic magnifications

Кратность увеличения микроскопа	Количество рекомендуемых к просмотру полей зрения	Техника просмотра препарата
1000× объектив 100× окуляр 10×/18 насадка 1×	300 площадь 300 полей зрения равна 7,5 мм ²	3 параллельных прохода вдоль препарата длина препарата, равная 20 мм, включает в себя примерно 110 полей зрения
630× объектив 63× окуляр 10×/18 насадка 1×	110–120 площадь 110–120 полей зрения равна 7,3–7,9 мм ²	1,5–2 параллельных прохода вдоль препарата длина препарата, равная 20 мм, включает в себя примерно 70 полей зрения
450× объектив 90× окуляр 5×/23 насадка 1×	140–150 площадь 140–150 полей зрения равна 7,4–8,0 мм ²	2 параллельных прохода вдоль препарата длина препарата, равная 20 мм, включает в себя примерно 77 полей зрения
450× объектив 40× окуляр 10×/18 насадка 1,125×	60 площадь 60 полей зрения равна 7,6 мм ²	1,5 параллельных прохода вдоль препарата длина препарата, равная 20 мм, включает в себя примерно 50 полей зрения
400× объектив 40× окуляр 10×/18 насадка 1×	45–50 площадь 45–50 полей зрения равна 7,2–8,0 мм ²	1 проход вдоль препарата длина препарата, равная 20 мм, включает в себя примерно 45 полей зрения
250× объектив 25× окуляр 10×/18 насадка 1×	20–25 площадь 20–25 полей зрения равна 8,1–10,2 мм ²	1 проход вдоль препарата длина препарата, равная 20 мм, включает в себя примерно 28 полей зрения
200× объектив 20× окуляр 10×/18 насадка 1×	15–20 площадь 15–20 полей зрения равна 9,5–12,7 мм ²	1 проход вдоль препарата длина препарата, равная 20 мм, включает в себя примерно 22 поля зрения

В международных руководствах, одобренных ВОЗ, также описан способ количественного учета результатов люминесцентной микроскопии в зависимости от используемого увеличения микроскопа [3]. Соответствие количества кислотоустойчивых микроорганизмов (КУМ), обнаруживаемых в ходе микроскопии, определенному варианту оценки препарата представлено в табл. 4.

Данная методика оценки является простой и удобной и также может быть рекомендована к использованию в практической работе для получения сопоставимых результатов микроскопического исследования.

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

- порядковый лабораторный номер;
- фамилия и инициалы больного;
- пол;
- возраст;
- адрес больного;

- районный регистрационный номер больного;
- название медицинского учреждения, направившего материал на исследование;
- номер истории болезни или карты больного;
- материал исследования;
- замечания по качеству материала;
- номер пробы материала (учет кратности обследования);
- цель проведения исследования (диагностика или мониторинг результатов химиотерапии, другое);
- 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.

Таблица 3. Градация результатов микроскопического исследования люминесцентным методом**Table 3.** The results of luminescence microscopy

Результат исследования	Форма записи результата	Интерпретация результата исследования
КУМ не обнаружены при просмотре 7–8 мм ² площади препарата (1–2 параллельных просмотра по длине препарата)	ОТР	Отрицательный
Обнаружено 1–2 КУМ в препарате при просмотре 7–8 мм ² площади препарата	Рекомендуется повторить исследование	Результат не оценивается
Обнаружено 3–9 КУМ в препарате при просмотре 7–8 мм ² площади препарата	«___» КУМ *	Положительный
Обнаружено 10–99 КУМ в препарате при просмотре 7–8 мм ² площади препарата	1+ **	Положительный
Обнаружено 1–10 КУМ в 1 поле зрения в каждом из 10–20 просматриваемых полей зрения	2+ **	Положительный
Обнаружено более 10 КУМ в 1 поле зрения в каждом из 5–10 просматриваемых полей зрения	3+ **	Положительный

* Указать точное число кислотоустойчивых микроорганизмов (КУМ)

* Indicate the precise number of acid-fast bacilli (AFB)

** Соответствие градаций

** Gradation meanings

Точное число	– единичные КУМ в препарате;
1+	– единичные КУМ в полях зрения;
2+	– умеренное количество КУМ;
3+	– значительное количество КУМ.
The precise number	– single AFB in a smear;
1+	– single AFB in visual fields;
2+	– a moderate number of AFB;
3+	– a significant number of AFB.

Таблица 4. Рекомендации ВОЗ по оценке результатов микроскопического исследования люминесцентным методом**Table 4.** The WHO recommendations on assessment of luminescence microscopy results

Результат исследования		Форма записи результата*
Кратность увеличения микроскопа 200×	Кратность увеличения микроскопа 400×	
Не обнаружено КУМ при просмотре одной длины препарата (~2 см)	Не обнаружено КУМ при просмотре одной длины препарата (~2 см)	КУМ не обнаружены
Обнаружено 1–4 КУМ при просмотре одной длины препарата (~2 см)	Обнаружено 1–2 КУМ при просмотре одной длины препарата (~2 см)	Требуется подтверждение**
Обнаружено 5–49 КУМ при просмотре одной длины препарата (~2 см)	Обнаружено 3–24 КУМ при просмотре одной длины препарата (~2 см)	Единичные КУМ
Обнаружено 3–24 КУМ в одном поле зрения	Обнаружено 1–6 КУМ в одном поле зрения	1+
Обнаружено 25–250 КУМ в одном поле зрения	Обнаружено 7–60 КУМ в одном поле зрения	2+
Обнаружено >250 КУМ в одном поле зрения	Обнаружено >60 КУМ в одном поле зрения	3+

* Количество КУМ указывает, насколько заразен пациент. Важно записывать именно то, что Вы видите.

* The number of AFB indicates how contagious the patient is. It is important to describe exactly what you see.

** Требуется подтверждение результата микроскопии другим специалистом или приготовление и исследование другого препарата.

** It is necessary to confirm the microscopy result by another specialist or by preparation and examination of another sample.

В бланке ответа на микроскопическое исследование, кроме вышеуказанных регистрационных параметров, которые заносятся в лабораторный регистрационный журнал, должны содержаться следующие сведения:

- оценка количества КУМ в препарате (см. табл. 3–4);
 - дата исследования;
 - фамилия сотрудника, проводившего анализ.
- Результат следует отправлять в медицинское учреждение или врачу, запросившему исследование. **Никогда не ограничивайтесь выдачей результата пациенту!**

Хранение препаратов

Приготовленные и просмотренные препараты хранят в защищенном от света месте при комнатной температуре. Для этих целей используют специальные маркированные коробки. Стекла не должны соприкасаться друг с другом для исключения повреждения целостности препарата, а также перекрестной контаминации препаратов. Положительные и отрицательные стекла рекомендуется хранить в коробках в том порядке, в котором проводилось исследование.

Для целей внешней оценки качества рекомендуется сохранять в лаборатории все стекла с препаратами до момента посещения лаборатории куратором, который отбирает препараты для проведения реанализа в вышестоящей лаборатории.

Препараты, окрашенные флуорохромными красителями, при длительном хранении могут утрачивать флуоресценцию. В связи с этим, контроль качества результатов бактериоскопии препаратов, окрашенных люминесцентным методом, представляет методические погрешности, то есть менее достоверен, чем контроль качества препаратов, окрашенных методом Циля–Нильсена.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»
107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Севастьянова Элина Викторовна – д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: elinasev@yandex.ru

Ларионова Елена Евгеньевна – к.б.н., старший научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: larionova_ena@mail.ru

Андриевская Ирина Юрьевна – научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: andrievskaya.iri@mail.ru

Смирнова Татьяна Геннадьевна – к.м.н., старший научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: s_tatka@mail.ru

Неправильные условия хранения препаратов также влияют на результаты их повторного просмотра. Например, полученный при реанализе препаратов ложноотрицательный результат может быть обусловлен тем, что предназначенные для повторного исследования препараты длительно сохранялись в местах, доступных прямому солнечному или ультрафиолетовому свету.

ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ МЗ РФ от 21 марта 2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». Приложение № 11 «Инструкция по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза».
2. Голышевская В.И., Егорова О.В., Севастьянова Э.В., Шульгина М.В. Люминесцентная микроскопия: Учебное пособие для проведения курсов обучения: «Культуральные методы диагностики туберкулеза», «Выявление туберкулеза методом микроскопии». М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада». – 2008. – 36 с.
3. Mycobacteriology Laboratory Manual. A publication of the Global Laboratory Initiative a Working Group of the Stop TB Partnership, 2014, 147 p.

REFERENCES

1. On improvement of TB control measures in the Russian Federation. Edict no. 109 by RF MoH as of 21.03.2003. Annex no. 11. A guideline to the unified methods of microbiology studies in TB detection, diagnosis and treatment. (In Russ.)
2. Golyshchenskaya V.I., Egorova O.V., Sevastyanova E.V., Shulgina M.V. Luminescence microscopy. A manual for training courses: Cultural methods of TB diagnosis, TB detection by microscopy. Moscow–Tver, Triada, 2008, 36 p. (In Russ.)
3. Mycobacteriology Laboratory Manual. A publication of the Global Laboratory Initiative a Working Group of the Stop TB Partnership, 2014, 147 p.

FOR CORRESPONDENCE:

Central TB Research Institute
2, Yauzskaya alley, 107564, Moscow, Russia

Elina V. Sevastyanova, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: elinasev@yandex.ru

Elena E. Larionova, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: larionova_lena@mail.ru

Irina Yu. Andrievskaya, Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: andrievskaya.iri@mail.ru

Tatiana G. Smirnova, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: s_tatka@mail.ru