

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
ТЕМАТИЧЕСКАЯ РАБОЧАЯ ГРУППА
«ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА» ПРИ РГВУ

УНИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ КИСЛОУСТОЙЧИВЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

Руководство для клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений

- В.В. Ерохин член-корреспондент РАМН, профессор, директор ГУ ЦНИИТ РАМН, председатель Тематической рабочей группы «Лабораторная диагностика туберкулеза» при РГВУ
- В.И. Голышевская доктор медицинских наук, профессор
- С.А. Попов кандидат медицинских наук, заведующий бактериологической лабораторией НИИФП ММА им. И.М. Сеченова
- В.А. Пузанов кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела микробиологии ЦНИИТ РАМН
- Г.В. Евгущенко кандидат медицинских наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией ЦНИИТ РАМН
- Э.В. Севастьянова кандидат технических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии ЦНИИТ РАМН
- Л.П. Мартынова кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии ЦНИИТ РАМН
- О.А. Иртуганова кандидат медицинских наук, Миссия МОМ в Москве

Москва, 2008

УДК 616-002.5-078(078)

ББК 55.4:52.64я75

У59

Унифицированный метод микроскопического выявления кислотоустойчивых микобактерий: Руководство для клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений / В.В. Ерохин, В.И. Голышевская, С.А. Попов, В.А. Пузанов, Г.В. Евгущенко, Э.В. Севастьянова, Л.П. Мартынова, О.А. Иртуганова. – Москва – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. – 132 с.

ISBN 978-5-94789-320-5

Настоящее руководство разработано по инициативе Российской академии медицинских наук (РАМН), Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (МЗ СР РФ), Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и в связи с необходимостью унификации и повышения качества микроскопических исследований, выполняемых для выявления кислотоустойчивых микобактерий.

Авторы выражают искреннюю признательность российским и зарубежным специалистам, оказавшим консультативную помощь в подготовке руководства.

Особую признательность авторы выражают:

И.Р. Дорожкой,

М.В. Шульгиной,

С.Г. Сафоновой,

R. Smithwick (США),

M.-L. Katila (Финляндия).

Отзывы, замечания и рекомендации всех заинтересованных специалистов будут с вниманием и благодарностью приняты авторами и учтены при переиздании Руководства.

Адрес для отзывов и предложений:

107564, Москва, Яузская аллея, д. 2.

ЦНИИТ РАМН (с пометкой «Руководство по микроскопии»)

Руководство разработано при поддержке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и издано при поддержке Программы Глобального фонда «Развитие стратегии лечения населения, уязвимого к ВИЧ/СПИДу и туберкулезу».

Руководство подготовлено для использования его в РФ с учетом имеющихся в стране отечественных нормативных документов и особенностей.

ББК 55.4:52.64я75

© Коллектив авторов, 2008

ISBN 978-5-94789-320-5

© Макет ООО «Издательство «Триада», 2008

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	6
Введение	8
1. Роль и задачи лабораторных подразделений	10
2. Сущность метода	14
3. Показания к применению метода	14
4. Ограничения метода	15
5. Характеристика метода	16
6. Организация рабочего места и оборудование для микроскопических исследований	18
6.1. План лаборатории для микроскопических исследований	18
6.2. Технология лабораторного процесса	20
7. Режимы и кратность обследования пациентов методами микроскопии	22
8. Сбор диагностического материала	23
8.1. Правила сбора диагностического материала	26
8.2. Оценка качества и количества диагностического материала	27
9. Хранение и транспортировка диагностического материала	31
10. Правила работы с диагностическим материалом	34
10.1. Прием диагностического материала	34
10.2. Техника безопасности при работе с материалом	35
11. Приготовление препаратов для микроскопических исследований	36
11.1. Оборудование и реактивы для приготовления препаратов из диагностического материала	37
11.2. Подготовка предметных стекол	39
11.3. Приготовление препаратов из нативного материала и необработанного осадка жидких материалов	41
11.4. Правила приготовления препаратов	44
11.5. Фиксация препаратов	45
12. Окраска диагностических препаратов	46
12.1. Окраска препаратов для световой микроскопии по методу Циля–Нильсена	46
12.1.1. Оборудование и реактивы для окраски по методу Циля–Нильсена	47
12.1.2. Процедура окраски по методу Циля–Нильсена	50
12.2. Окраска препаратов для люминесцентной микроскопии	55
12.3. Хранение приготовленных препаратов	57

13. Техника микроскопического исследования препаратов	57
13.1. Оборудование и реактивы для проведения микроскопического исследования препаратов, окрашенных по методу Циля–Нильсена	57
13.2. Порядок подготовки микроскопа для проведения микроскопического исследования	59
13.3. Порядок проведения микроскопического исследования препаратов	62
13.4. Морфологические характеристики кислотоустойчивых микобактерий при окраске по методу Циля–Нильсена	65
14. Причины ошибок при микроскопических исследованиях	66
14.1. Ошибки при выполнении лабораторных процедур	66
14.1.1. Причины ложноположительных результатов	66
14.1.2. Причины ложноотрицательных результатов	67
14.2. Операторские ошибки (ложно положительные или ложно отрицательные)	68
14.3. Ошибки, вызванные неисправностью техники	68
15. Учет и регистрация результатов микроскопического исследования	69
15.1. Учет результатов микроскопического исследования при окраске по методу Циля–Нильсена	69
15.2. Регистрация результатов микроскопического исследования	70
16. Обучение персонала клинико-диагностических лабораторий	72
17. Обеспечение качества микроскопических лабораторных исследований	74
17.1. Внутрилабораторный контроль качества микроскопических исследований	75
17.2. Внешняя оценка качества микроскопических исследований	77
17.2.1. Внешняя оценка качества микроскопических исследований с использованием контрольных образцов	78
17.2.2. Повторный анализ клинических образцов и препаратов в лабораториях более высокого уровня	80
17.2.3. Инспекционный контроль качества микроскопических исследований	81
18. Организация и управление работой лаборатории	83
18.1. Устройство и режим работы лаборатории	83
18.2. Лабораторное оборудование	84
18.3. Правила организации рабочего места микроскописта	85
18.4. Исследуемый материал и бланки исследований	86
18.5. Реактивы и красители	87

18.6. Окрашивание и исследование препаратов	87
18.7. Выдача ответов и администрирование.....	89
19. Обеспечение безопасности работ и гигиена помещений	89
19.1. Общие правила устройства лаборатории	90
19.2. Общие правила безопасности и гигиены при работе с туберкулезной инфекцией	95
19.3. Техника безопасности лабораторных процедур	97
19.4. Гигиена лабораторных помещений	99
19.5. Дезинфицирующие средства	100
19.6. Оборудование и принадлежности для обеспечения безопасности лабораторных процедур.....	104
19.7. Устранение последствий утечки загрязненного материала.....	107
20. Утилизация загрязненных материалов	110
20.1. Автоклавирование	112
20.2. Кипячение и сжигание	113
Приложение 1. Список оборудования и реактивов для микроскопических исследований	114
1. Основное оборудование	114
2. Дополнительное оборудование и расходные материалы	114
3. Реактивы	116
Приложение 2. Составные части и правила пользования световым микроскопом.....	117
1. Рекомендации по настройке и эксплуатации микроскопа	117
2. Устройство и составные части светового микроскопа	121
Приложение 3. Учетно-отчетные формы	128
Дополнительная литература.....	131

ПРЕДИСЛОВИЕ

Данное издание является руководством по организации и проведению микроскопических исследований с целью выявления кислотоустойчивых микобактерий в различном диагностическом материале. Оно составлено с учетом современных требований, предъявляемых к клиничко-диагностическим лабораториям лечебно-профилактических учреждений Российской Федерации, а также в соответствии с нормами, принятыми международными организациями, работающими в рамках Программы борьбы с туберкулезом.

Руководство предназначено для использования в повседневной работе и обучения персонала клиничко-диагностических лабораторий общей лечебной сети, противотуберкулезной и ведомственных служб здравоохранения, а также других подразделений, участвующих в оказании противотуберкулезной помощи населению на территории Российской Федерации.

В основу данного руководства положены следующие нормативные документы, руководства и публикации:

- Федеральный закон № 77-ФЗ от 18.06.2001 г. «О предупреждении распространения туберкулеза в Российской Федерации»;
- Подпрограмма «Неотложные меры борьбы с туберкулезом в России» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера (2002–2006 годы)», утвержденная Постановлением Правительства Российской Федерации № 790 от 13.11.2001 г.;
- Постановление Правительства Российской Федерации от 25.12.2001 г. № 892 «О реализации Федерального закона «О предупреждении распространения туберкулеза в Российской Федерации»;
- Приказ Министерства здравоохранения РФ № 109 от 21.03.2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации»;
- Приказ Минздрава Российской Федерации № 64 от 21.02.2000 г. «О номенклатуре клинических лабораторных исследований»;
- Приказ Министерства здравоохранения РФ № 380 от 25.12.1997 г. «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации»;
- Приказ Минздравмедпрома РФ № 117 от 03.05.1995 г. (с изменениями от 19 февраля 1996 г.) «Об участии клиничко-диагностических лабораторий

лечебно-профилактических учреждений России в Федеральной системе внешней оценки качества клинических лабораторных исследований»;

- Приказ Министерства здравоохранения РФ № 8 от 12.01.1999 г. «О введении в действие Положения о порядке инспекционного контроля за деятельностью клинико-диагностических и экспертных лабораторий в здравоохранении»;
- Приказ Минздравсоцразвития РФ № 50 от 13.02.2004 г. «О введении в действие учетно-отчетной документации мониторинга туберкулеза»;
- Федеральные санитарные правила, нормы и гигиенические нормативы «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами» (СП 1.2.731 – 99);
- Федеральные санитарные правила, нормы и гигиенические нормативы «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности» (СП 1.2.036 – 1995);
- Инструкция «О противозидемическом режиме работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями инфекционных и паразитарных заболеваний III–IV групп в г. Москве» (1991 г);
- Методические рекомендации ВОЗ – «Laboratory Services in Tuberculosis Control. Parts I – III». Switzerland, Geneva, WHO, 1998;
- Методические рекомендации Международного союза борьбы с туберкулезом для лабораторных служб в рамках национальных программ борьбы с туберкулезом – «The Public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory Network». France, Paris, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), 1998;
- Методические руководства Центров по контролю и профилактике заболеваний США – «Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory». USA, Atlanta, Centers for Disease Control (CDC), 1985 & 1995.

В соответствии с Федеральными санитарными правилами, нормами и гигиеническими нормативами (СП 1.2.731–99) **к работе с материалом, зараженным туберкулезными и нетуберкулезными микобактериями (III–IV группы), допускаются лаборатории, имеющие разрешение Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ (ныне ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора).**

Это положение не распространяется на клинико-диагностические лаборатории общей лечебной сети, проводящие исследования мазков из необработанного материала и не работающие с культурой возбудителя туберкулеза.

ВВЕДЕНИЕ

Современная напряженная эпидемическая ситуация по туберкулезу в России и во всем мире требует осуществления быстрого и эффективного выявления возбудителя туберкулеза и контроля за его распространением. Одним из наиболее быстрых и недорогих методов выявления возбудителя туберкулеза является микроскопическое исследование, основанное на биологической особенности *Mycobacterium tuberculosis* – кислотоустойчивости.

Обнаружение кислотоустойчивых микобактерий (КУМ) в диагностическом материале имеет важное значение для выявления бактериовыделителей – наиболее эпидемически опасных больных туберкулезом. Известно, что в течение года такие больные способны инфицировать в среднем от 20 до 30 и более человек.

В связи с этим интенсификация выявления случаев туберкулеза является важной задачей лабораторных служб всех лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) независимо от их ведомственной принадлежности и форм собственности.

Приказом МЗ РФ № 380 от 25.12.1997 г. микроскопическое исследование мокроты для выявления кислотоустойчивых микобактерий включено в перечень обязательных исследований, осуществляемых в клиничко-диагностических лабораториях (КДЛ) общей лечебной сети (ОЛС). Основные правила микроскопической диагностики материала от больных туберкулезом изложены в Приказе № 109 от 21.03.2003 г. (Приложение № 10).

Задачей осуществления этих исследований на современном этапе является достижение необходимого качества исследований, что достигается в тесном сотрудничестве учреждений общей лечебной сети и противотуберкулезной службы, а также системы обеспечения качества исследований.

С целью реализации изложенных принципов на территории Российской Федерации вводятся унифицированные методы микроскопических исследований для выявления кислотоустойчивых микобактерий и система обучения персонала, адресованные всем лечебно-профилактическим учреждениям независимо от их ведомственной принадлежности.

Необходимое качество микроскопических исследований обеспечивается введением системы внешнего и внутрилабораторного контроля качества исследований, инспекционного контроля, лицензирования лабораторий и т. д. Эти функции возложены на Федеральную систему внешней оценки качества клинических лабораторных исследований (ФСВОК), службы Рос-

потребнадзора, ведущие противотуберкулезные научно-исследовательские институты и областные противотуберкулезные диспансеры.

Для преемственности учета случаев заболевания туберкулезом между лечебно-профилактическими учреждениями различных ведомств и противотуберкулезной службой введены единые правила учета и отчетности для всех клинико-диагностических лабораторий.

Для обеспечения безопасности проводимых работ лаборатории должны иметь адекватные средства индивидуальной защиты, соблюдать правила, разработанные Госсанэпиднадзором РФ, а также иметь лицензию на проведение данных видов исследований.

1. РОЛЬ И ЗАДАЧИ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОДРАЗДЕЛЕНИЙ

Широко распространенная сеть лечебно-профилактических учреждений РФ насчитывает более 12 000 клинико-диагностических лабораторий. Лечебно-профилактические учреждения общей лечебной сети являются первым звеном медицинской помощи, куда обращается заболевший и где проводят первичное лабораторное обследование.

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

Ввиду широкой доступности лечебно-профилактических учреждений ОЛС для населения, а также с учетом указанных выше положений Приказа МЗ РФ № 380, **первичное обследование больных с подозрением на туберкулез возложено на подразделения общей лечебной сети.**

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

Выявление больных туберкулезом осуществляется в два этапа.

- **Первичное обследование** – в учреждениях общей лечебной сети (поликлиниках, больницах, медико-санитарных частях различной ведомственной подчиненности и др.) и в противотуберкулезных учреждениях.
- **Верификация результатов первичного обследования** – диагностика, дифференциальная диагностика и постановка на диспансерный учет – в учреждениях противотуберкулезной службы.

Указанная схема диктует необходимость направить основные усилия всех служб на раннее выявление больных туберкулезом, что включает в себя:

- организацию активного участия КДЛ ЛПУ в выявлении бактериовыделителей методом прямой микроскопии;
- организацию обучения врачей ОЛС принципам ранней диагностики туберкулеза;
- внедрение системы обеспечения качества лабораторных исследований;

- обеспечение безопасности работ;
- обеспечение взаимодействия подразделений ОЛС, занятых в выявлении больных туберкулезом, и территориальных противотуберкулезных учреждений.

Под первичным микроскопическим обследованием подразумевается прямая бактериоскопия мазка нативной мокроты, окрашенного по методу Циля–Нильсена.

Для максимальной стандартизации проводимых исследований и обеспечения достоверности получаемых результатов представляется оправданной практика централизации микроскопических исследований по выявлению кислотоустойчивых микобактерий в наиболее подготовленных, крупных лабораториях.

Лаборатории с нагрузкой менее 500–2000 мазков в год (в зависимости от эффективности микроскопии) не могут поддерживать свой профессиональный уровень. Рекомендуемая нагрузка на лабораторию должна быть оптимальной – от 10–15 исследований в неделю и не более 20 исследований в день на одного сотрудника. При незначительных нагрузках в небольших лабораториях не удается выдержать на должном уровне качество проводимых бактериоскопических исследований с целью выявления КУМ. Малое количество выполняемых анализов не позволяет лабораторным работникам поддерживать необходимые навыки для качественного проведения бактериоскопического исследования. Кроме того, большинство мелких лабораторий выполняют микроскопические исследования для выявления КУМ в неудовлетворительных материально-технических условиях, которые не позволяют обеспечить качество и достоверность получаемых результатов, а также безопасные условия работы персонала с инфекционным материалом.

Сокращение числа КДЛ ОЛС, выполняющих исследования с целью выявления кислотоустойчивых бактерий, а также осуществление в них контроля качества бактериоскопической диагностики туберкулеза в полном объеме и проведение лицензирования указанных лабораторий, способствуют повышению эффективности их работы и улучшению качества выполняемых исследований.

В связи с этим в зависимости от географических особенностей, плотности населения, транспортных возможностей и других социально-экономических факторов на базе лабораторий центральных районных больниц по решению местных органов здравоохранения могут быть созданы центры

микроскопии. В этих центрах обслуживаются все пациенты близлежащих лечебно-профилактических учреждений. Создание центров должно предусматривать организацию регулярной и своевременной доставки диагностического материала из прикрепленных учреждений.

Это возлагает на действующие в системе противотуберкулезной службы РФ микробиологические лаборатории дополнительные обязанности по оказанию организационно-методической помощи, обучению и обеспечению качества исследований по микроскопическому выявлению возбудителя туберкулеза в КДЛ общей лечебной сети, поскольку Федеральная система внешней оценки качества клинических лабораторных исследований (ФСВОК) не предусматривает выполнение указанных функций.

Для обеспечения эффективной и безопасной работы лаборатории по микроскопическому выявлению кислотоустойчивых микобактерий руководитель лабораторной службы должен обратить внимание:

- на организацию помещения, оборудованного по правилам работы с инфекционным материалом;
- организацию и оснащение рабочих мест для проведения исследований;
- материальное обеспечение процесса исследований и бесперебойное снабжение расходными материалами;
- обучение персонала необходимым лабораторным технологиям и правилам ведения учетной и отчетной документации;
- организацию правильного сбора, транспортировки и хранения диагностического материала.

Одновременно в лаборатории должна быть обеспечена биологическая безопасность выполнения всех лабораторных процедур и исключена возможность распространения нозокомиальной туберкулезной инфекции.

Указанное положение диктует необходимость обязательного соблюдения следующих требований:

- разработка и использование административных мер защиты персонала;
- обязательное использование эффективных противотуберкулезных дезинфицирующих средств;
- использование инженерных и индивидуальных средств защиты;

- соблюдение санитарных и гигиенических правил при оборудовании и уборке помещений;
- обучение персонала правилам работы, обеспечивающим биологическую безопасность при выполнении повседневных исследований и во внештатных ситуациях (например, таких, как утечка заразного материала).

Важной задачей лабораторных подразделений является организация системы своевременного и адресного информирования лечебных подразделений о результатах лабораторных исследований.

В обязанности клинико-диагностических и бактериологических лабораторий лечебно-профилактических учреждений ОЛС и различного ведомственного подчинения входят:

- правильная организация рабочих мест для проведения микроскопических исследований;
- обеспечение оборудованием и расходными материалами для проведения микроскопических исследований на выявление КУМ;
- оценка качества и отбор доставленного диагностического материала;
- правильная регистрация образцов;
- приготовление мазков из нативной мокроты и окраска;
- микроскопия мазков и оценка результатов;
- регистрация результатов исследований и своевременное информирование лечебных подразделений;
- соблюдение требований санитарных инструкций и правил;
- обеспечение внутрилабораторного контроля качества исследований;
- участие в ФСВОК и других мероприятиях по внешней оценке качества исследований;
- обеспечение биологической безопасности персонала лаборатории;
- организация системы непрерывного обучения персонала лаборатории и повышения его профессионального уровня;
- поддержание оборудования в рабочем состоянии;
- соблюдение правил использования и хранения реактивов;
- подготовка отчетных мероприятий;
- обеспечение мероприятий для внешней оценки качества исследований.

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Для первичного обследования пациентов используют метод прямой бактериоскопии, при котором:

- 1) обнаружение кислотоустойчивых микобактерий осуществляется непосредственно в нативном диагностическом материале (чаще всего – в мокроте) без предварительной гомогенизации и обработки детергентами;
- 2) микроскопическое исследование осуществляется с помощью световой микроскопии препаратов, окрашенных по методу Циля–Нильсена;
- 3) результаты исследования выражаются в полуколичественных показателях, отражающих содержание кислотоустойчивых микобактерий в исследуемом препарате.

Этот метод является методом быстрого, доступного и экономически эффективного выявления и оценки содержания кислотоустойчивых микобактерий в диагностическом материале.

3. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

В основе первичного выявления случаев туберкулеза лежит **целенаправленное клиническое обследование пациентов**, обратившихся за медицинской помощью с жалобами или симптомами, подозрительными в отношении туберкулеза. Пациент обследуется трижды по определенной схеме.

Метод Циля–Нильсена применяется в клинико-диагностических лабораториях ОЛС при проведении первичного обследования у лиц с подозрением на заболевание туберкулезом и составляет диагностический минимум, дополняя клинико-рентгенологическую диагностику и данные анамнеза пациента:

- 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.

Кроме того, метод Циля–Нильсена применяется для контроля химиотерапии в процессе лечения с целью установления абацеллирования больных туберкулезом.

При положительных или сомнительных результатах бактериоскопии при первичном обследовании, а также при отрицательных результатах бактериоскопии, но с наличием клинико-рентгенологических симптомов, пациент направляется в противотуберкулезное учреждение для подтверждения или исключения диагноза «туберкулез» более чувствительными диагностическими методами.

Эффективность применения метода Циля–Нильсена зависит от правильной организации работы клинических подразделений. Она существенно увеличивается при обучении врачей-терапевтов общего профиля принципам ранней диагностики туберкулеза и повышении их настороженности в отношении туберкулезной инфекции. Тесное сотрудничество с лабораториями противотуберкулезной службы также повышает эффективность и качество работы клинико-диагностической лаборатории ОЛС.

Другим условием эффективного применения метода Циля–Нильсена является организация системы своевременного и адресного информирования лечебных подразделений, направивших материал на исследование, а также соответствующих противотуберкулезных учреждений о результатах лабораторных исследований.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Метод Циля–Нильсена является высокоспецифичным, однако его чувствительность ниже, чем у культурального метода, и проводить исследования ряда материалов только методом микроскопии нецелесообразно, поскольку эти исследования имеют малую информативность.

В связи с этим не рекомендуется исследовать только микроскопическим методом различные материалы внелегочной локализации – такие, как внутрисполостные жидкости (асцитическая, плевральная, суставная), ткани, гной и моча.

Следует также избегать прямой микроскопии промывных вод желудка, поскольку кислотоустойчивые бактерии часто присутствуют в пище и воде, а следовательно, и в желудке. Подобные микроорганизмы практически невозможно дифференцировать при микроскопии, и не следует полагаться на положительный результат. Идентификацию микобактерий можно проводить только в специализированных учреждениях.

Прямая микроскопия такого материала, как смывы с задней стенки глотки, практически бесполезна. Отрицательный бактериоскопический результат в подобном случае не позволяет исключить заболевание туберкулезом,

в связи с чем рекомендуется провести культуральные исследования материала.

Что касается мочи, то мазки, сделанные из полученного центрифугированием осадка неинформативны, так как в моче могут присутствовать нетуберкулезные микобактерии. При наличии кислотоустойчивых бактерий в моче необходимо провести дополнительные культуральные исследования.

Следует также отметить, что отрицательные результаты бактериоскопии на наличие КУМ в диагностическом материале не могут быть единственным основанием для исключения диагноза «туберкулез».

5. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА

Исследование образцов мокроты методом микроскопии – сравнительно быстрый, простой и недорогой метод. У большинства пациентов с заразными формами туберкулеза имеются соответствующие симптомы со стороны органов дыхания, поэтому микроскопическое исследование мокроты у людей, обращающихся в медицинские учреждения с симптомами, подозрительными в отношении туберкулезной инфекции, является наиболее быстрым способом выявления эпидемически опасных случаев этого заболевания. При своевременно начатом лечении такие больные перестают быть источником инфекции. В результате разрывается цепь передачи возбудителя от человека к человеку и прерывается распространение инфекции.

При внелегочных формах туберкулеза наряду с материалом из очага поражения желательна параллельно исследовать мокроту (при ее наличии), так как внелегочные формы туберкулеза нередко сочетаются со специфическим поражением органов дыхания.

Метод световой микроскопии с окраской мазков по Цилю–Нильсену позволяет выявить кислотоустойчивые микобактерии при их содержании порядка 5 000–10 000 и более в 1 мл материала, что имеет место у больных с прогрессирующими формами процесса. Больные с малыми формами заболевания без деструкции легочной ткани обычно выделяют значительно меньшее количество микобактерий.

Однако данный метод позволяет выявить наиболее эпидемически опасные случаи заболевания, которые являются источниками инфекции для общества. Методом микроскопии выявляется приблизительно от 25 до 65% бациллярных больных, диагностированных культуральным методом; однако при проведении исследований у наиболее инфекционной части больных

туберкулезом диагностическая чувствительность метода микроскопии достигает 90%.

Чувствительность метода микроскопии можно повысить, если исследовать от пациента несколько проб мокроты. Поэтому в большинстве случаев при первичном выявлении больного туберкулезом практикуется сбор и исследование не менее трех проб мокроты. Результаты многочисленных исследований показали, что многократные микроскопические исследования позволяют распознавать бациллярные формы туберкулеза легких с массивным бактериовыделением с суммарной чувствительностью, равной и превышающей 95%. При этом установлено, что результативность микроскопической диагностики туберкулеза легких повышается следующим образом: при первичном исследовании одного (первого) мазка выявляется 80–82% бактериовыделителей, второго – на 10–14% больше и при исследовании третьего мазка – еще на 5–8% больше.

Таким образом, при подозрении на туберкулез легких **рекомендуется исследовать не менее трех проб мокроты.**

Отрицательный результат микроскопического исследования не исключает диагноз «туберкулез», так как в мокроте пациентов может содержаться меньшее число микобактерий, чем может выявить микроскопия.

Кроме того, причиной отрицательного результата микроскопического исследования может стать плохое качество исследуемого материала, а также нарушение техники подготовки мазков мокроты.

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

При микроскопическом исследовании мазка из патологического материала нельзя определить видовую принадлежность выявленных КУМ и специфически идентифицировать возбудитель туберкулеза.

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

Это объясняется тем, что в природе существует большое число нетуберкулезных кислотоустойчивых микобактерий, вызывающих микобактериозы, а также сапрофитов, не вызывающих заболевания человека. Мик-

роскопически они трудноотличимы от *Mycobacterium tuberculosis*. Поэтому выявление КУМ при микроскопическом исследовании не позволяет поставить диагноз «туберкулез»; метод Циля–Нильсена является только одним из важных (но не решающих) диагностических тестов.

Видовая идентификация микобактерий, позволяющая отнести выявленные кислотоустойчивые микроорганизмы к возбудителю туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*), возможна только при выделении культуры микобактерий

Несмотря на указанные недостатки, бактериоскопический метод исследования остается одним из обязательных лабораторных методов диагностики туберкулеза. Его преимущества заключаются в быстроте получения результата и относительной простоте исполнения. Метод позволяет в короткие сроки (в течение суток) обнаружить наиболее эпидемически опасных больных туберкулезом и микобактериозами и остается актуальным микробиологическим методом выявления туберкулеза и микобактериозов на первичных этапах обследования больных, а также при динамическом наблюдении бактериовыделения в процессе лечения.

6. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОЧЕГО МЕСТА И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

6.1. План лаборатории 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 точности движения и обработки материала.

В объединенных клиничко-диагностических лабораториях для проведения микроскопических исследований на кислотоустойчивые микобактерии желательно выделять отдельное помещение. Выделение специальной комнаты для проведения исследований методом Циля–Нильсена отдельно от остальных клинических исследований в наибольшей степени позволяет обеспечить безопасность проведения анализа. Данная комната должна быть разделена на рабочие зоны, которые позволят разделить манипуляции с высоким и низким уровнем инфицирования персонала (рис.1).

Стены, потолки и полы должны быть покрыты гладким, не адсорбирующим материалом, который можно легко мыть и регулярно дезинфициро-

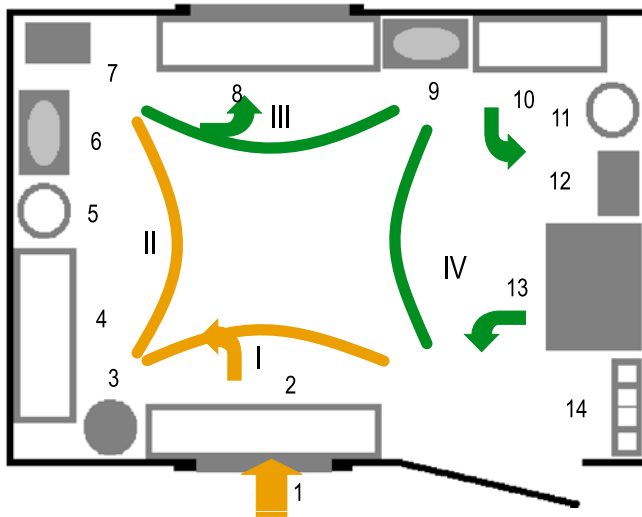


Рис. 1. Размещение рабочих мест в лаборатории для микроскопических исследований. Стрелками указано движение инфицированного материала в процессе обработки и анализа.

I. Зона для приема и регистрации диагностического материала

1. Окно для приема образцов.
2. Рабочий стол для разбора, маркировки и регистрации поступающих образцов.
3. Место для дезинфекции и контейнера для отработанных материалов.

II. Зона для приготовления и окраски мазков

4. Стол для приготовления и сушки мазков (желательно под вытяжкой или в боксе с наличием вытяжного устройства). Идеальный вариант – вытяжной шкаф.
5. Контейнер для отработанных материалов.
6. Лабораторная раковина для окрашивания мазков (при наличии в лаборатории вытяжного шкафа рекомендуется производить в нем как приготовление, сушку и фиксацию мазков, так и их окраску).

III. Рабочее место для микроскопии

7. Шкаф для хранения мазков.
8. Стол для микроскопии.
9. Раковина для мытья рук.

IV. Место для регистрации результатов исследований

10. Стол для учета результатов исследований.
11. Контейнер для отработанных материалов.
12. Рабочий стол и весы.
13. Шкаф для посуды и реактивов.
14. Полка с ответами.

вать. Этот материал должен быть устойчивым к химическим реактивам, используемым в лаборатории.

Пол не должен быть скользким, его не следует подметать или натирать. Во избежание образования пыли в лаборатории допускается только **влажная ежедневная уборка с использованием дезинфицирующих средств.**

Помещение лаборатории и отдельные рабочие места должны быть обеспечены достаточным освещением.

В помещении для микроскопии должны быть четыре зоны. Технологический цикл должен быть устроен так, чтобы исключить попадание чистых материалов в инфицированную зону. И наоборот, инфицированные материалы должны быть максимально локализованы в отведенной для них зоне.

Всего в данном помещении должны быть, по крайней мере, 2 раковины – лабораторная и для мытья рук (или одна раковина с двумя отделениями – для окраски мазков и для мытья рук) и 4 стола или 4 изолированных рабочих места.

Столы должны быть удобными для работы сидя. 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. Это является обязательным требованием при проведении микроскопического исследования.

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

Доступ в лабораторию должны иметь только ее сотрудники. Вход в лабораторию осуществляется через единственную дверь, которая всегда должна быть закрыта, что обеспечивает режим регламентированного доступа специалистов.

6.2. Технология лабораторного процесса

Материал для анализа поступает в лабораторию через *окно для приема анализов* (1) на специальный *стол для приема и регистрации образцов* (2). На этом столе должен иметься специальный легко дезинфицируемый лоток или поднос, на который помещают флаконы с материалом. Здесь проводят осмотр и выбраковку материала. При наличии следов протечки поврежденный флакон помещают в специальный бикс или контейнер для последующей дезинфекции, остальные флаконы дезинфицируют снаружи.

В сопроводительном бланке делают соответствующую отметку и запрашивают новый образец. После сверки поступивших образцов и приложенных направлений образцам присваивают порядковый номер. Флаконы маркируют, нанося номер на стенку флакона.

По завершении приема анализов, проверки правильности маркировки поступивших образцов и ее соответствия данным направлений и сопроводительных документов поступившие документы дезинфицируют температурным воздействием (это может производиться в сушильном или сухожаровом шкафу при температуре 100 °С в течение 40 минут). В дальнейшем эти документы помещают в отдельную папку и хранят в определенном месте в течение года. Материал передают в основную рабочую зону (II) для приготовления мазков, а соответствующую информацию вносят в регистрационный лабораторный журнал, используя подходящее место в зоне IV, например, стол для учета результатов (10). Для предотвращения возможного инфицирования лабораторных журналов записи вносят до начала подготовки мазков, после уборки и дезинфекции рабочего места зоны I.

Маркированный материал передают в *основную лабораторную зону* для подготовки мазков (II). Здесь должны находиться рабочий стол, раковина или емкость для промывки мазков и шкаф для хранения препаратов. Сушку подготовленных мазков осуществляют в этой же зоне, например, на отведенном месте стола (4) или на отдельном приспособленном столе с защитой от сильных потоков воздуха. Крайне желательно иметь в данной зоне вытяжной шкаф, наличие которого позволит в большей степени обеспечить безопасность работы персонала. При наличии вытяжного шкафа рекомендуется производить в нем все манипуляции, связанные с работой с инфекционным материалом: приготовление, сушка, фиксация и окраска мазков.

Место для микроскопии (зона III) включает рабочий стол с микроскопом и раковину для мытья рук. Здесь результаты бактериоскопии вписывают в соответствующий бланк и в регистрационный лабораторный журнал. Результаты помещают в ячейки специальной полки (14) и затем отправляют в соответствующие подразделения или учреждения. Желательно, чтобы полка для бланков с результатами исследования имела специальные ячейки, маркированные по названиям учреждений, направляющих материал для исследования.

Перечень основного и дополнительного оборудования, реактивов и расходных материалов, необходимых для работы лабораторий, осуществляю-

щих прямую микроскопию мазка с окраской по Цилю–Нильсену, представлен в **Приложении 1**.

Все используемое в лаборатории оборудование и реактивы должны иметь сертификат соответствия и быть зарегистрированными в установленном порядке.

7. РЕЖИМЫ И КРАТНОСТЬ ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ МЕТОДАМИ МИКРОСКОПИИ

При первом обращении больного к врачу с симптомами, подозрительными на туберкулез, необходимо в течение 2–3 дней исследовать не менее трех порций мокроты, из которых не менее двух порций должны быть собраны под наблюдением медицинского персонала.

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

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

Вторую пробу пациент собирает самостоятельно рано утром следующего дня и доставляет ее в лечебное учреждение.

Третью проба собирается под наблюдением медицинского работника в тот же день, после того как пациент доставит в лечебное учреждение вторую пробу материала.

Хорошо зарекомендовала себя схема, которая предусматривает контролируемый сбор диагностического материала дважды в первый день (при этом сбор второго образца должен быть осуществлен не ранее чем через 2 часа после первого) с обязательной доставкой третьего образца, собранного самостоятельно в домашних условиях. Данная схема наиболее показана в тех случаях, когда есть риск неполучения всех образцов по причине недисциплинированности пациента.

В условиях стационара при организации первичного выявления все три пробы от пациента необходимо собирать рано утром в течение трех последовательных дней.

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 заменять мокроту.

8. СБОР ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

В данном разделе изложены основные правила сбора диагностического материала при проведении первичного обследования пациентов.

При сборе мокроты необходимо иметь в виду, что в момент ее откашливания создается очень высокий риск воздушно-капельного распространения инфекции. В связи с этим необходимо, чтобы сбор мокроты производился в специально выделенном для этих целей отдельном хорошо вентилируемом помещении, оснащенном бактерицидной лампой и средствами дезинфекции, или на открытом воздухе. Это могут быть приспособленные помещения («кашлевые» или комнаты для сбора мокроты) с вмонтированной форточной вентиляцией или воздушным зонтом, обеспечивающими удаление инфицированного воздуха, устроенные по типу ингаляционных комнат. Помещения должны хорошо проветриваться, стены должны хорошо поддаваться дезинфекции, необходимы бактерицидный облучатель, дезинфицирующие средства. В комнате должны быть вывешены четкие и понятные инструкции, как правильно собирать мокроту. Необходим стул для отдыха пациентов, который может понадобиться при наступлении гипервентиляции легких пациента. В промежутках между посещениями пациентов комната должна хорошо вентилироваться и дезинфицироваться, чтобы избежать инфицирования как обслуживающего медицинского персонала, так и самого пациента и собираемого им диагностического материала.

Идеальным вариантом является установка в комнате для сбора мокроты специальной кабины для сбора мокроты либо отделение части помещения полустеклянной перегородкой для изоляции места сбора мокроты и защиты медицинского работника.

Материал для исследования на КУМ собирают в специальные флаконы или контейнеры для сбора мокроты с плотно завинчивающимися, обеспечивающими герметичность крышками. Применение герметизированных флаконов преследует двоякую цель: предотвращение просачивания содержимого и загрязнения окружающей среды чрезвычайно стойкими к физическим воздействиям микобактериями и предохранение исследуемого ма-

териала от загрязнения широко распространенными в окружающей среде кислотоустойчивыми микроорганизмами.

В связи с этим флаконы (контейнеры) для сбора качественного диагностического материала (рис. 2) 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 сжиганию;
- должны иметь удобные плотно завинчивающиеся или герметически закрывающиеся крышки;
- объем флаконов должен составлять 20–50 мл, что вполне достаточно для проведения всех видов исследований;
- иметь широкое отверстие для сбора мокроты (не менее 35 мм в диаметре), чтобы пациент мог легко отделять мокроту внутрь флакона, не подвергая загрязнению его наружную поверхность, и не испытывать психологических затруднений;
- флаконы должны быть изготовлены из прозрачного материала, чтобы можно было визуально оценить количество и качество собранной пробы, не открывая крышку, а впоследствии отбирать гнойные комочки для приготовления мазка непосредственно из флакона;
- материал, из которого изготовлены флаконы, должен легко подвергаться маркировке и надежно сохранять ее на всем протяжении хранения, транспортировки и проведения исследования.

При выборе типа используемых флаконов предпочтение следует отдавать тем, которые мягко открываются и закрываются во избежание образования аэрозолей и разбрызгивания материала. Последнее часто наблюдается при многократном использовании алюминиевых резьбовых крышек, которые сильно окисляются в процессе многократного автоклавирования и открываются со значительным усилием. Посуду с защелкивающимися или трудно закручивающимися крышками лучше не использовать. Использование стеклянных флаконов и крышек со шлифом не рекомендуется в силу их плотного склеивания материалом пробы в процессе транспортировки и хранения.

Перед выдачей пациенту флаконы многоразового пользования должны быть подвергнуты стерилизации, тщательно вымыты и повторно просте-

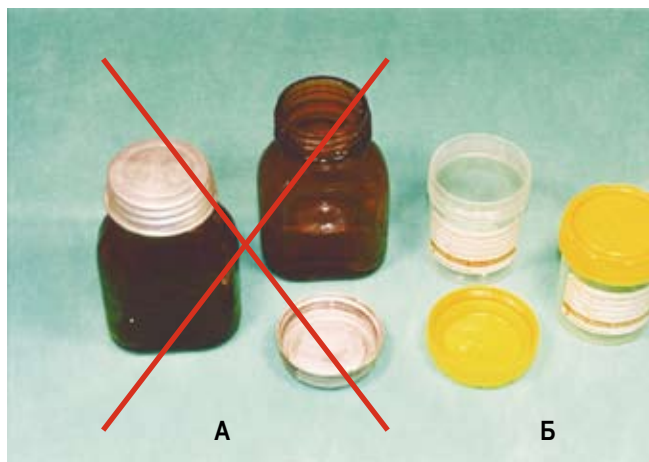


Рис. 2. Флаконы для сбора материала

рилизваны. При использовании флаконов многоразового пользования во избежание лабораторного загрязнения диагностического материала **лаборатория должна постоянно следить за качеством мытья и стерилизации этих флаконов.**

Наилучшим вариантом является использование для сбора мокроты одноразовых пластиковых прозрачных контейнеров объемом 20–50 мл. Использование таких контейнеров позволяет легко оценить качество и объем собранного материала, а при приготовлении мазков – проводить выбор гнойных комочков для приготовления мазка непосредственно из контейнера, избегая чрезвычайно опасного этапа выливания мокроты в чашку Петри.

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

- при исследовании мокроты необходимо соблюдать правила сбора материала (см. раздел 8.1);
- собранный материал необходимо как можно быстрее доставить в лабораторию;
- хранение и транспортировка материала должны осуществляться в соответствии с правилами (см. раздел 9);
- при перевозке материала необходимо тщательно следить за сохранностью флаконов и точностью маркировки, необходимо иметь спе-

циальный транспортировочный контейнер, обеспечивающий сохранность флаконов и маркировки.

Для исследования на туберкулез используется разнообразный материал. Так как туберкулез легких является наиболее частой формой туберкулезного поражения, исследуют в основном мокроту, а также другой материал, полученный из верхних отделов легочной ткани.

При патологических процессах в легких чаще всего исследуют следующие материалы: мокроту; отделяемое верхних дыхательных путей, полученное после аэрозольной ингаляции; промывные воды бронхов; бронхоальвеолярные смывы; материал, получаемый при бронхоскопии, трансбронхиальной и внутрилегочной биопсии; аспират из бронхов; мазки из гортани; экссудаты; мазки из ран; промывные воды желудка (преимущественно у детей) и др.

Мокрота. У пациентов, выделяющих мокроту в достаточном количестве, для повышения результативности исследования собирают ее утреннюю порцию.

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, каким образом получен материал для анализа.

8.1. Правила сбора диагностического материала

Сбор мокроты должен проводиться в присутствии и при непосредственном участии среднего медицинского персонала.

При этом лицам, ответственным за сбор мокроты, следует руководствоваться следующими правилами.

1. 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 и резкого выдоха.
2. Необходимо предупредить пациента, что он должен предварительно 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 па-

циента, выбирая свое положение таким образом, чтобы направление движения воздуха было от него к пациенту. Так как медицинский работник работает с пациентами в течение дня, для обеспечения его безопасности рекомендуется использовать респираторы (см. Приложение 1). Медицинский работник должен открыть стерильный флакон для сбора мокроты, снять с него крышку и передать его пациенту.

В идеальном случае пациент должен откашливать мокроту в специальной кабине, установленной в помещении для сбора мокроты; либо в той части помещения для сбора мокроты, которая специально изолирована для откашливания мокроты пациентом. В этом случае медицинский работник может передать пациенту флакон, не открывая его, и наблюдать за процедурой сбора мокроты через стекло.

4. Стоя позади пациента, либо наблюдая за ним через стекло, следует рекомендовать ему держать флакон как можно ближе к губам и сразу же отделять в него мокроту по мере ее откашливания. Выделение мокроты усиливается после одного или нескольких глубоких вдохов и резкого выдоха.
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 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.

8.2. Оценка качества и количества диагностического материала

Ни одна качественно работающая лаборатория не сможет компенсировать плохо собранный материал.

При исследовании мокроты пациентов с подозрением на туберкулез понятие «качественная мокрота» имеет конкретное определение. Качественным материалом можно считать свежевыделенную мокроту, имеющую

слизистый или слизисто-гноеный характер, а также содержащую плотные белесоватые включения. Желтоватый, серый или бурый цвет мокроты позволяет предположить, что материал имеет диагностическую ценность. 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 многократное (не менее трех раз) исследование мокроты. Такая тактика позволяет увеличить число положительных находок.

По завершении сбора мокроты медицинский работник должен оценить качество и количество собранного материала и сделать соответствующую отметку в бланке направления.

Для аэрозольных ингаляций пользуются портативными или стационарными аэрозольными ингаляторами. Для проведения ингаляции рекомендуется раствор, в 1 л которого содержится 150 г хлорида натрия (NaCl) и 10 г бикарбоната натрия (Na_2CO_3). Для приготовления раствора используется **стерильная дистиллированная вода**. Это обусловлено тем, что в водопроводной воде нередко содержатся кислотоустойчивые сапрофиты, которые при микроскопическом исследовании могут стать причиной ложноположительного результата.

Для провокации отделения мокроты необходимо вдохнуть от 30 до 60 мл подогретого до 42–45 °С раствора. Продолжительность ингаляции должна составлять не менее 10–15 минут. Так как вдыхаемый во время процедуры ингаляции аэрозоль 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, **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, в связи с чем им 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 проводится врачом-оториноларингологом. При проведении процедуры 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, приготовленного на стерильной дистиллированной воде для исключения возможности попадания в желудок кислотоустойчивых сапрофитов, которые могут содержаться в водопроводной воде. После этого вводят желудочный зонд и собирают содержимое желудка в стерильный флакон. Материал **немедленно доставляют в лабораторию и подвергают обработке**, чтобы исключить повреждающее влияние на возбудителя содержащихся в материале желудочных ферментов.

Особенно результативен метод получения промывных вод желудка в сочетании с предварительной аэрозольной ингаляцией. Промывные воды желудка следует забирать через 30 минут 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 удается 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, перикардиальная, 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 (при 3000 g) с последующей микроскопией осадка. Плотный материал тщательно измельчают стерильными ножницами в стерильной ступке со стерильным песком, смешивают с 0,5–1,0 мл изотонического раствора и энергично растирают до получения гомогенной массы при постепенном доведении объема добавляемого изотонического раствора до 4–5 мл. Полученную массу отстаивают в течение 1–2 мин. Затем из надосадочной жидкости с помощью стерильной пипетки приготавливают мазок.

Мочу (среднюю или всю утреннюю порцию) собирают 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 (см. **раздел 4**) анализ мочи на микобактерии должен предусматривать **обязательное трехкратное исследование** в условиях специализированной бактериологической лаборатории.

Проводить микроскопическое исследование мочи и ряда других жидких материалов в условиях КДЛ не рекомендуется. Это связано с тем, что, как уже указывалось выше, мазки, сделанные из осадка мочи и некоторых других жидких материалов, малоинформативны. Кроме того, для получения осадка необходимо проводить центрифугирование инфекционного материала при определенных условиях. В связи с этим указанный метод исследования мочи и некоторых жидких материалов на наличие микобактерий обычно используется только в бактериологических лабораториях, которые для повышения результативности анализа параллельно с микроскопическим выполняют культуральное исследование указанного материала.

9. ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Хранение материала. Организация сбора диагностического материала и быстрой доставки в лабораторию является одной из важнейших задач при проведении микробиологических исследований.

Если в данном медицинском учреждении микроскопические исследования на выявление кислотоустойчивых микобактерий не проводятся, собранный диагностический материал должен как можно быстрее доставляться в централизованную лабораторию. Доставка должна осуществляться 1–2 раза в неделю при условии обязательного сохранения материала в промежутках между доставками в холодильнике.

Срок хранения материала в нативном виде при комнатной температуре не должен превышать 24 часа. Рекомендуется до момента отправки в лабораторию хранить герметично закрытые флаконы с материалом в вертикальном положении в специально отведенном для этих целей холодильнике, который по окончании каждого рабочего дня опечатывают и запирают. Срок сохранения материала в холодильнике без добавления консервирующих средств не должен превышать 72 часа. При более длительном хранении необходимо применять консервирующие средства.

Длительное хранение материала (более недели) в условиях высокой температуры, а также воздействие на материал прямого солнечного света или ультрафиолетового излучения, могут привести к тому, что содержащиеся в материале кислотоустойчивые микобактерии могут утратить присущую им кислотоустойчивость. Это может служить причиной ложноотрицательных результатов микроскопических исследований материала.

Транспортировка. Во время транспортировки материал следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей и тепла. Если транспортировка и хранение занимают не более 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. Однако ни в коем случае не следует допускать повторного замораживания и оттаивания материала, так как это способствует снижению жизнеспособности микобактерий.



Рис. 3. Транспортировочный контейнер

Для транспортировки материала рекомендуется пользоваться биксами или специальными транспортировочными ящиками (рис. 3) с мягкими, легко стерилизующимися прокладками на дне и с гнездами или прокладками для флаконов и/или контейнеров. Флаконы или контейнеры (желательно пластиковые, одноразового употребления) с диагностическим материалом должны быть плотно закупорены или снабжены завинчивающимися крышками. Во избежание протечки жидких материалов и нарушения целостности флаконов они должны быть закреплены в транспортировочных ящиках в вертикальном положении и снабжены прокладками, предохраняющими их от повреждений. 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.

Каждая проба материала должна быть промаркирована, иметь соответствующее направление, а вся партия – заполненный сопроводительный бланк (см. **Приложение 3**).

Во избежание инфицирования бланков направлений и сопроводительных документов необходимо вкладывать их в чистый конверт или пластиковый пакет и передавать непосредственно в руки водителю автотранспорта, не помещая документы 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 диагностического материала, контролировать его качество, правильность консервации и транспортировки и своевременность доставки в лабораторию.

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

Во всех случаях должен быть составлен график транспортировки материала, согласованный в обеих инстанциях. Водитель машины должен быть обучен правилам обращения с инфекционным материалом и иметь флакон с дезинфицирующим средством и перевязочный материал или ветошь для дезинфекции в случае протечки материала.

График работы сотрудников лаборатории должен предусматривать своевременный прием, регистрацию и немедленную обработку доставленного машиной материала, 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 флакона с материалом; во избежание ошибок при последующих манипуляциях не допускается нанесение маркировки только на крышку флакона;
- идентификационный номер маркировки каждого флакона с материалом должен точно соответствовать номеру, указанному в сопроводительном листе;
- для каждой пробы материала должен иметься заполненный бланк направления на микробиологическое исследование с указанием цели необходимого исследования (см. **Приложение 3**);

- каждая партия материала должна иметь сопроводительный лист, в котором должны быть указаны необходимые данные о каждом пациенте (см. **Приложение 3**);
- в сопроводительном листе должна быть указана дата транспортировки материала и подпись сотрудника, ответственного за отправку.

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

10. ПРАВИЛА РАБОТЫ С ДИАГНОСТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ

10.1. Прием диагностического материала

Поступающие для исследования пробы материала, доставляемые в лабораторию пациентами, медицинскими работниками или специальными транспортными средствами медицинских учреждений, принимают на отдельном столе (рис. 1), соблюдая следующие правила:

- прием поступающих проб и их осмотр следует проводить в одноразовых перчатках и масках;
- перед тем как открыть транспортировочный контейнер, необходимо продезинфицировать его наружную поверхность, протерев ее 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) – уничтожьте их или автоклавируйте и запросите новый образец, отметив в сопроводительном бланке;
- выбракованные образцы переложить в отдельный бикс для последующего автоклавирования либо дезинфекции; при наличии протечек обработать целые флаконы дезинфицирующим раствором;
- чистые, незагрязненные снаружи флаконы без следов протечки и трещин перенести на специальный, легко дезинфицируемый лоток, расположив их в порядке нумерации;
- 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 утилизировать одноразовые перчатки и вымыть руки;
- выдать водителю обменную стерильную посуду;
- подписать сопроводительные документы и сделать необходимые отметки на дубликаты сопроводительного листа;
- простерилизовать сопроводительные документы в сухожаровом шкафу;
- занести в лабораторный журнал сведения о каждом пациенте и полученном от него материале (см. Приложение 3).

10.2. Техника безопасности при работе с 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 аэрогенным путем в составе аэрозольных частиц. В процессе подготовки материала для исследования создается высокий риск образования аэрозолей с диаметром частиц от 1 до 5 мкм. Именно эти мельчайшие частицы являются основной «респираторной» фазой аэрозоля, способной при дыхании проникать в легочные альвеолы и оседать в них, формируя очаг инфекции.

Для предупреждения случаев внутрилабораторного заражения необходимо свести к минимуму возможность образования аэрозолей. Для защиты лабораторных работников от инфицирующих частиц необходимы хорошая вентиляция, защитная одежда, маски-респираторы 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.

Основным источником образования инфекционных аэрозолей в лабораториях являются манипуляции по приготовлению мазков для микроскопического исследования.

Наиболее безопасным является приготовление мазков в ламинарном шкафу биологической безопасности. Однако такой шкаф является дорогостоящим оборудованием и обычно используется в бактериологических лабораториях, работающих с культурой возбудителя. Для КДЛ ОПС идеальным вариантом для приготовления мазков из нативной мокроты является использование вытяжного шкафа, но можно использовать и стол под вытяжкой или бокс 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 переливании проб из флаконов для сбора мокроты в чашку Петри;
- 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 использовании для разбора мокроты тонких дрожащих бактериологических петель;
- 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.

11. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

На практике используются два метода микроскопического исследования материала:

- **метод прямой микроскопии**, когда мазок приготавливается непосредственно из необработанного (нативного) диагностического материала или его осадка (в случае жидкого материала);

- **метод микроскопии мазка из обработанного осадка материала**, подготовленного для культурального исследования путем обработки разжижающими и деконтаминирующими средствами и последующего центрифугирования при 3000 g в безопасной центрифуге (такие возможности, как правило, имеются только в специализированных бактериологических лабораториях).

Первый, наименее затратный метод широко применяется в тех лабораториях, в которых производится только микроскопическое исследование мазков с окраской по методу Циля–Нильсена и исследованием в световом микроскопе (клинико-диагностические лаборатории общей лечебной сети).

Метод люминесцентной микроскопии является более эффективным. Однако 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 определенной 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 и получению ложноотрицательных результатов исследования. Поэтому окраску люминесцентными красителями рекомендуется применять при исследовании мазков, приготовленных из осадка материала, обработанного для культурального исследования. В связи с этим данный метод обычно используется только в бактериологических лабораториях, которые помимо микроскопического выполняют еще и культуральное исследование, при этом мазок и посев производятся обязательно из одной и той же порции материала.

11.1. Оборудование и реактивы для приготовления препаратов из диагностического материала

Приготовление мазков начинают с подготовки оборудованного рабочего места, предназначенного для этой процедуры (рис. 4). Рабочее место для этого должно быть постоянным, хорошо освещенным и обеспечивать удобство и безопасность работы.

Перед началом работы оборудование, реактивы и материалы необходимо разместить так, чтобы было удобно работать, и в дальнейшем стараться соблюдать этот привычный порядок. Набор красителей и инструментов желательно закрепить за данным рабочим местом и не использовать их для других лабораторных методик.

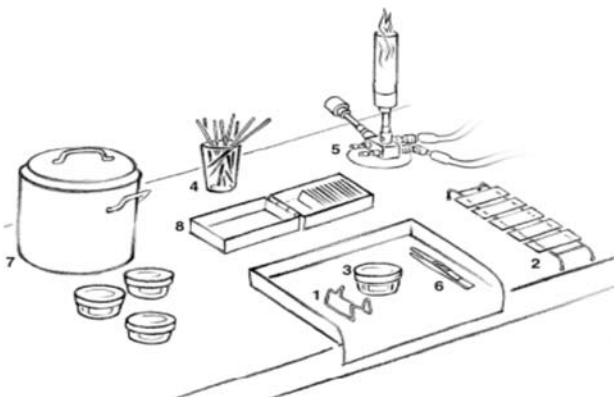


Рис. 4. Пример организации рабочего места для приготовления мазков

- 1 – подставка для приготовления мазка на одном предметном стекле;
- 2 – сушилка или стеклянный мостик для готовых мазков;
- 3 – контейнер с мокротой, подлежащей исследованию;
- 4 – деревянные палочки-аппликаторы;
- 5 – газовая горелка Бунзена или спиртовка;
- 6 – пинцет;
- 7 – металлический бачок или ведро с крышкой для использованного заразного материала;
- 8 – коробка с предметными стеклами для мазков

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

Для приготовления мазков необходимо следующее (рис. 4):

- лотки, выстланные медицинскими салфетками или фильтровальной бумагой – для препарирования материала и для просушки приготовленных мазков (для просушки мазков могут быть также использованы специальные штативы);
- флаконы с поступившим в лабораторию исследуемым материалом;
- деревянные палочки (аппликаторы) диаметром 3 мм и длиной 22–25 см или бактериологические петли для забора сгустков мокроты и распределения их по стеклу. Можно использовать препаровальные иглы, бактериологические шпатели или другие микробиологические инструменты одноразового или многократного использования;

- однократно используемые новые предметные стекла (обезжиренные, без царапин и сколов);
- маркировочный карандаш для нанесения идентификационного номера на стекло;
- анатомический пинцет или щипцы для взятия предметных стекол с мазками;
- емкость (колба, эксикатор, стеклянная банка и т. д.) с отмытым речным песком, залитым техническим спиртом (70°), для механической очистки бактериологической петли от остатков материала перед очередной стерилизацией ее в пламени горелки;
- спиртовка или газовая горелка Бунзена для прокаливания петель, игл и пр. (ее можно использовать для фиксации и окрашивания препаратов);
- контейнеры для сбора и последующего автоклавирования использованного материала и загрязненной посуды; при отсутствии в лаборатории автоклава для обеззараживания посуды и отработанного диагностического материала используются специальные баки, в которых осуществляется обеззараживание путем кипячения;
- емкость с дезинфицирующим раствором для обработки поверхности стола или других объектов при случайном попадании на них диагностического материала;
- ватные шарики для обработки дезинфицирующим раствором.

11.2. Подготовка предметных стекол

Предметные стекла являются частью оптической системы микроскопа. Их оптические свойства закладываются разработчиками при проектировании прибора и, соответственно, учитываются при построении изображения исследуемого объекта. Качество предметных стекол сказывается на результатах микроскопии, поэтому предметные стекла должны быть стандартизованы по коэффициенту преломления, толщине, равномерности и т. д. В связи с этим необходимо использовать стандартные предметные стекла, соответствующие ГОСТу 9284-75 или международным стандартам. Лучше, если часть стекла (приблизительно 1/4) имеет матовую поверхность – на ней удобно наносить маркировку. Использование самодельных стекол, нарезанных из бытового стекла, может привести к большому числу артефактов, как оптического происхождения, так и тинкториального: из-за микротрещин, следов прокатки и т. д.

Процедура приготовления мазков начинается с подготовки предметных стекол. Для выявления кислотоустойчивых микобактерий 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 они могут быть недостаточно хорошо отмыты от предыдущего материала, что может привести к получению ложноположительных результатов.

Новые предметные стекла кипятят в 1% растворе двууглекислого натрия (10 г 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, после чего протирают насухо.

Более популярен другой метод обработки новых предметных стекол. Сначала их замачивают в водопроводной воде, а затем кипятят в мыльном растворе, приготовленном на хозяйственном мыле (не следует использовать стиральные порошки или моющие средства!). После этого обе поверхности каждого стекла промывают с помощью щетки под струей проточной воды. Промытые стекла помещают в бак или большую кастрюлю и в течение 2–3 часов промывают проточной водой. Затем протирают насухо.

Для обезжиривания вымытые и высушенные стекла помещают в герметически закрытые емкости со смесью Никифорова или с 96% этиловым спиртом. Стекла должны подвергаться обезжириванию не менее 24 часов. Непосредственно перед приготовлением мазка стекла повторно протирают насухо.

По окончании микроскопического исследования все стекла с мазками должны сохраняться в лаборатории для целей внешней оценки качества в течение 1 года либо до момента посещения лаборатории куратором, который отбирает мазки для проведения реанализа в вышестоящей лаборатории.

По истечении указанного срока использованные стекла, на которых при микроскопическом исследовании были обнаружены кислотоустойчивые микобактерии, подлежат дезинфекции и обязательному уничтожению, поскольку они не должны использоваться повторно.

Стекла с отрицательными мазками также рекомендуется уничтожать. Однако при отсутствии в КДЛ необходимого количества стекол для работы стекла с отрицательными мазками можно вновь использовать (для проведения других клинических исследований) после специальной обработки:

- провести дезинфекцию методом кипячения в 2% мыльно-содовом растворе в течение 45 минут от момента закипания;

- промыть проточной водой;
- промыть дистиллированной водой;
- обезжирить в 96% этиловом спирте или смеси Никифорова.

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 приготавливают 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 оставляют не обработанной 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 должен превышать двух суток. Другим способом закрепления осадка жидкого материала является использование сыворотки крови. На чистом стекле смешивают каплю сыворотки с 1–2 каплями осадка материала, распределяют смесь по стеклу, высушивают и используют далее как обычно.

11.3. Приготовление препаратов из нативного материала и необработанного осадка жидких материалов

Если мазок из нативного материала будет окрашиваться по методу Циля–Нильсена и исследоваться в световом микроскопе, pH мазка не корригируется.

Перед приготовлением мазка на один конец стекла наносят полный номер пробы исследуемого материала, под которым он зарегистрирован в лабораторном регистрационном журнале при приеме материала. Номер наносят с помощью несмываемого маркера или воскового карандаша по стеклу с таким расчетом, чтобы в процессе окраски этот номер сохранился. По этой причине наиболее удобными следует считать использование алмазных карандашей.

При приготовлении мазков стекла берут за ребра. **Не следует касаться их рабочей поверхности руками или перчатками!**

Процедура приготовления мазков для прямой микроскопии из нативной мокроты

В настоящее время, согласно рекомендациям международных экспертов, метод с использованием процедуры переливания мокроты из контейнера или флакона в чашку Петри не применяется (во избежание образования инфекционных аэрозолей в процессе данной манипуляции). В связи с этим необходимо, чтобы материал поступал в лабораторию в прозрачных контейнерах, поскольку в этом случае создаются условия для выбора частиц для приготовления мазка непосредственно из контейнера.

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

При приготовлении мазков наиболее удобно пользоваться деревянной палочкой-аппликатором, которую перед выбором гнойных комочков разламывают пополам (рис. 5).

Затем из разных участков образца мокроты выбирают 2–3 наиболее плотных гнойных комочка, переносят их на стекло и равномерно распределяют тонким слоем в центре стекла на поверхности размером не менее 1 × 2 см. При этом необходимо учитывать, что толщина мазка должна быть оптимальной (индикатор толщины указан в разделе 11.4). Забор комочков производят с помощью сломанных концов палочки (рис. 6). Это обеспечивает более надежную фиксацию материала к палочке и облегчает последующее его нанесение на поверхность предметного стекла.

На одно предметное стекло следует наносить только один мазок. Недопустимо многократное наслаивание материала на предметное стекло.

Использованные для приготовления мазка палочки сбрасывают в банку с дезинфицирующим раствором или в контейнер с отработанным заразным



Рис. 5. Подготовка аппликаторов к работе



Рис. 6. Распределение материала на предметном стекле с помощью аппликаторов

материалом. **Для каждого образца мокроты используется новая палочка!**

Практикуется также приготовление мазков с помощью двух бактериологических петель или двух препаровальных игл.

Кроме того, применяется способ приготовления мазка с использованием одной бактериологической петли (при этом количества материала в одной петле достаточно для приготовления одного мазка) (рис. 7).

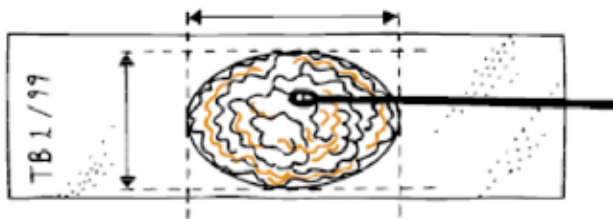


Рис. 7. Приготовление мазка с помощью бактериологической петли



Рис. 8. Емкость с песком и спиртом для очистки бактериологических петель

В случае, когда мазок готовят с помощью бактериологических петель, они могут быть использованы повторно после очистки от остатков мокроты путем 2–3-кратного погружения их в банку с песком, залитым спиртом (рис. 8), и последующего прожигания в пламени горелки до появления красного цвета.

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

Приготовление мазка из осадка нативного материала

Мазки из осадка необработанного нативного материала готовятся на стеклах, предварительно обработанных яичным белком, или с сывороткой крови, как это описано выше.

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 микобактерий долгое время находиться во взвешенном состоянии. В связи с этим рекомендуется производить центрифугирование при 3000 g , в течение 20 мин.

Для приготовления мазка полученный в пробирке осадок ресуспендируют с помощью пипетки и наносят на стекло 1–2 капли осадка, распределяя его тонким слоем в центре стекла (рис. 9).



Рис. 9. Приготовленный мазок для микроскопии

11.4. Правила приготовления препаратов

Мазок из нативного материала или из его осадка должен располагаться в центре предметного стекла, занимая площадь не менее 1×2 см. Такая площадь мазка вполне достаточна для проведения эффективного микроскопического исследования и в то же время значительно повышает безопасность манипуляции приготовления мазка, его окраски и последующей микроскопии, так как периферические части и ребра предметного стекла остаются незагрязненными инфекционным материалом.

При этом микроскопист, исследующий от 100 до 300 полей зрения, в зависимости от применяемого увеличения просматривает от 1 до 4% площа-

ди такого мазка. Этого вполне достаточно для обнаружения диагностически значимого количества микобактериальных клеток.

Не рекомендуется готовить мазки способом «растяжки» материала между двумя предметными стеклами. Такой способ сопровождается образованием биологически опасного аэрозоля, при этом также страдает качество мазков.

При приготовлении мазка для микроскопического исследования необходимо добиваться оптимальной 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 соскользнуть с него при многократных процедурах смены рабочих растворов и воды. Кроме того, толстый мазок плохо просматривается при микроскопическом исследовании.

При оптимальной толщине мазка через него можно прочесть газетный шрифт, расположенный позади стекла на расстоянии 5–10 см.

11.5. Фиксация препаратов

Приготовленные указанным выше способом мазки помещают на 15–30 минут на лотки (подносы), выстланные фильтровальной бумагой, или в специальные штативы для сушки мазков и высушивают при комнатной температуре в вытяжном шкафу или (при отсутствии такового) в специально отведенном месте.

Ни в коем случае не допускается фиксация над пламенем горелки не высохших полностью, сырых мазков!

При окраске по Цилю–Нильсену ***стекла с высохшими мазками*** пинцетом или специальными щипцами берут за конец, на который нанесена маркировка, и ***трижды медленно проводят через среднюю часть пламени спиртовки или верхнюю часть пламени 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 использовании очень тонких (менее 1,2 мм) или очень толстых (более 2 мм) стекол время фиксации подбирают экспериментально, находя оптимум между полнотой фиксации материала и сохранением тинкториальных свойств бактериальных клеток, находящихся в прямой зависимости от продолжительности и температуры нагревания.

Оптимальным с точки зрения профилактики распространения инфекции является метод, предложенный А. Hein. Этот метод фиксации мазков используется при окраске как по Цилю–Нильсену, так и люминесцентными красителями. Согласно этому методу, предметные стекла с мазками раскладывают на жестяные или эмалированные подносы и помещают в сушильный шкаф, в котором их сначала высушивают при 37 °С. Затем температуру повышают до 105 °С и спустя 10 минут шкаф выключают. При таком методе достигаются надежное прикрепление мазка к стеклу и гибель микобактерий, как находящихся в материале мазка, так и случайно попавших на поднос. Фиксирующая температура не должна превышать 105 °С, чтобы не изменить тинкториальные свойства микобактерий.

Практикуется также фиксация мазков в сухожаровом шкафу при 85 °С в течение 45 минут с момента достижения указанной температуры, или при 80 °С в течение 1 часа, или при 65–75 °С в течение не менее 2 часов.

Высушенные и фиксированные мазки не подлежат длительному хранению и должны сразу же окрашиваться. **Нефиксированные мазки ни в коем случае нельзя оставлять открытыми на ночь**, так как это увеличивает опасность распространения инфекции.

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

12. ОКРАСКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Унифицированным методом окраски мазков, приготовленных непосредственно из диагностического материала (метод прямой микроскопии), является метод Циля–Нильсена.

12.1. Окраска препаратов для световой микроскопии по методу Циля–Нильсена

Метод окраски по Цилю–Нильсену основан на свойстве красителя фуксина (темно-красного цвета при обычных условиях) терять цветность до полной прозрачности при увеличении кислотности среды. Его использование для выявления микобактерий основано на высокой прочности гидрофобной клеточной стенки этих микроорганизмов, не разрушающейся под действием раствора серной кислоты или солянокислого спирта в течение

некоторого времени и не позволяющей проникнуть кислотам внутрь клетки и обесцветить проникший туда краситель.

Метод окраски по Цилю–Нильсену основан на использовании нескольких специальных методических приемов:

- **фиксация** – перед началом окраски убедиться, что мазок фиксирован (**3–5 сек** над пламенем горелки);
- **окраска фуксином** (*с подогреванием до видимого отхождения паров; с экспозицией 5 мин после отхождения паров*) – при одновременном воздействии нагревания и сильного протравливающего вещества фенола (карболовой кислоты), на котором готовится основное красящее вещество фуксин, повышается способность красителя проникать в структуры клеточной стенки микобактерий и окрашивать их. Клеточная стенка микобактерий состоит из гидрофобных соединений: миколовых кислот, липидов и восков, которые в обычных условиях препятствуют проникновению красителя в клеточную стенку;
- **обесцвечивание (3 мин)** – окрашенные структуры микобактериальной клетки в силу присущего им свойства устойчивости к воздействию кислот, щелочей и спиртов обладают способностью удерживать краситель даже после длительного обесцвечивания их 25% раствором серной кислоты или 3% раствором солянокислого спирта. Окраску утрачивают только некислотоустойчивые структуры препарата, тогда как кислото- и спиртоустойчивые микобактерии стойко удерживают краситель и остаются после обесцвечивания окрашенными в малиново-красный цвет;
- **контрастирующая окраска (1 мин)** – обесцвеченные элементы мазка (фон) докрашивают метиленовым синим, что создает контрастный голубой фон и облегчает микроскопическое выявление кислотоустойчивых микроорганизмов, окрашенных в малиново-красный цвет.

12.1.1. Оборудование и реактивы для окраски по методу Циля–Нильсена

Организовать место для окраски наиболее целесообразно в вытяжном шкафу либо вблизи лабораторной мойки прямоугольной формы, над которой производится окраска мазков. Для окраски мазков по методу Циля–Нильсена (рис. 10) необходимы следующие лабораторные принадлежности и реактивы.

Лабораторные принадлежности:

- раковина или специальный лоток, на который помещают штатив с препаратами;
- специальный штатив («рельсы») для окраски мазков на предметных стеклах;
- пинцет или щипцы для взятия предметных стекол;
- газовая или спиртовая горелка для фиксации препарата (если мазки не фиксированы в сушильном шкафу) и его подогревания при окрашивании карболовым фуксином;
- металлический прут для приготовления факельной горелки (ватного тампона, который может использоваться вместо спиртовой горелки для подогревания препарата при окрашивании карболовым фуксином);
- фильтровальная бумага 4 × 1,5 см для окраски мазков карболовым фуксином;
- красящий раствор карболового фуксина для окраски кислотоустойчивых микобактерий;
- обесцвечивающий раствор: 25% раствор серной кислоты или 3% раствор солянокислого спирта;
- вода для промывания мазков;
- раствор контрастирующего красителя: 0,3% водный раствор хлорида метиленового синего;



Рис. 10. Рабочее место для окраски мазков по Цилю–Нильсену

- штатив для просушивания окрашенных стекол на воздухе в вертикальном или наклонном положении;
- дезинфицирующий раствор.

Реактивы:

- спирт этиловый марки ОП-2, ТУ 6-09-45-12-77, 96°;
- кислота соляная концентрированная, ГОСТ 3118-77;
- кислота серная концентрированная, ГОСТ-4204-77;
- фенол кристаллический (карболовая кислота), ГОСТ 6417-72;
- фуксин основной, ТУ 6-093804-74;
- метиленовый синий хлорид, ТУ 6-09945-75;
- глицерин, чда, ГОСТ 6259-72;
- вода дистиллированная для растворения красителей, ГОСТ 6709-72.

Все реактивы, используемые для окраски мазков по методу Циля–Нильсена, должны иметь степень очистки не менее категории «химически чистый» (ХЧ).

Никогда не используйте аптечные формы карболовой кислоты.

Помимо указанных отечественных реактивов могут использоваться соответствующие реактивы зарубежных фирм, допущенные к применению МЗ и СР РФ и имеющие степень очистки не ниже, чем «химически чистый».

Кроме того, в лаборатории могут быть использованы стандартизованные и допущенные к применению в установленном порядке готовые наборы красителей для окраски мазков методом Циля–Нильсена.

Приготовление растворов

Для контроля правильности приготовления красителей желательно иметь отдельную рабочую тетрадь, в которую заносятся данные о приготовленных навесках красителей, марка фирмы-производителя и т. д.

Раствор 1. Насыщенный спиртовой раствор фуксина (3%):

- растереть в ступке 0,3 г основного фуксина с 2–3 каплями глицерина;
- добавить по каплям 10 мл 96% этилового спирта, тщательно перемешать.

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, перемешать.

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) 25% раствор серной кислоты:

- к 75 мл дистиллированной воды осторожно долить 25 мл концентрированной серной кислоты, постепенно насливая ее по стенкам сосуда. Аккуратно перемешать. Содержимое нагреется.

Никогда не добавляйте воду в кислоту!

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

- в колбу наливают 97 мл 96% этилового спирта и затем вносят пипеткой 3 мл концентрированной соляной кислоты, аккуратно насливая ее по стенкам колбы.

Раствор 5. Рабочий раствор метиленового синего (0,3%):

- 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, содержащая:

- название содержащегося в емкости раствора;
- дату его приготовления;
- срок годности приготовленного раствора;
- фамилию специалиста, готовившего раствор.

Растворы хранят при комнатной температуре, в темном месте.

Рабочий раствор карболового фуксина может храниться не более 2–4 недель, так как после этого срока фуксин начинает выпадать в осадок, что изменяет заданные свойства раствора.

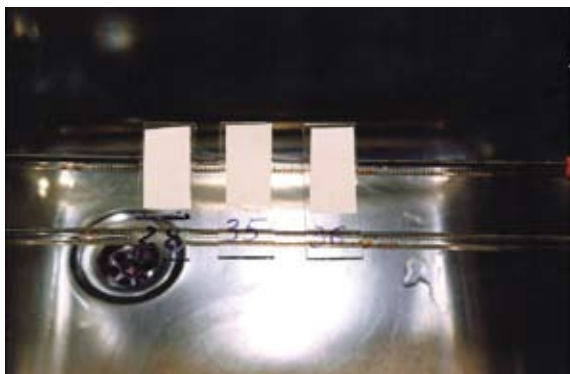
Другие рабочие растворы значительно более стойки при хранении. Однако рекомендуется готовить их одновременно с раствором карболового фуксина, т. е. через каждые 2–4 недели. Это позволит быть уверенным в качестве используемых красителей.

12.1.2. Процедура окраски по методу Циля–Нильсена

1. Подготовленные, маркированные, высушенные и фиксированные препараты располагают на горизонтальном штативе («салазки», или

- «рельсы») так, чтобы они не касались друг друга, а их маркировка (номера) была направлена в одну сторону. На стандартные «салазки» помещают не более 12 стекол. Практика показывает, что это оптимальное число для одновременного окрашивания препаратов, позволяющее соблюсти время экспозиции всех процедур. Такой штатив можно изготовить из двух отрезков стеклянных пипеток или дрота и двух кусков резиновых трубок подходящего диаметра (рис. 11).
2. На каждый препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги (размером примерно 4 × 1,5 см) так, чтобы она закрывала мазок полностью (рис. 11а). Фильтровальную бумагу используют для того, чтобы краска не разливалась по стеклу. Одновременно за счет ее использования предотвращается возможное осаждение кристаллов краски на мазок. Если же используются свежеприготовленные и свежefильтрованные растворы красителей, эту процедуру можно опустить.
 3. Препараты заливают **с избытком** раствором карболового фуксина, наливая его на фильтровальную бумагу с таким расчетом, чтобы весь препарат был **обильно** смочен (рис. 11б), и затем нагревают препараты над пламенем горелки или с помощью приготовленной факельной горелки (рис. 11в) до появления над препаратом легкого облачка паров. При подогревании препарата следует внимательно следить за тем, чтобы краска не закипала и фильтровальная бумага не подсыхала.
 4. Подогретый мазок оставляют на **5 минут**, чтобы краситель проник в клеточную стенку микобактерий и окрасил ее (рис. 11г).
 5. **Осторожно (!)** пинцетом снимают фильтровальную бумагу и помещают ее в емкость с дезинфицирующим раствором.
 6. **Осторожно (!)** смывают остатки краски слабой струей проточной воды или водой из резервуара (рис. 11д). Вода должна быть комнатной температуры или холодной.
 7. После каждой промывки во избежание разбавления реактивов каждый мазок пинцетом аккуратно ставят на ребро, чтобы стекли остатки воды.
 8. Заливают мазок обесцвечивающим раствором 25% серной кислоты или 3% солянокислым спиртом, добиваясь визуального эффекта полного обесцвечивания. Продолжительность процедуры обесцвечивания – **3 минуты**.
 9. Промывают проточной водой, как описано выше.
 10. Мазок докрашивают 0,3% раствором метиленового синего до **60 секунд**.

a)



b)



в)



з)



д)



Рис. 11. Размещение препаратов на штативе для окраски и процедура окрашивания препаратов: а) – наложение полосок фильтровальной бумаги; б) – способ заливки препарата фуксином; в) – отхождение паров; г) – окрашивание препаратов карболовым фуксином; д) – промывание препаратов водой

11. Промывают проточной водой, как описано выше.
12. Мазок высушивают на открытом воздухе при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении (рис. 12).

Не следует промокать препарат! (рис. 13).

В результате окраски кислотоустойчивые микобактерии окрашиваются в малиново-красный цвет, а другие микроорганизмы и клеточные элементы – в голубой.

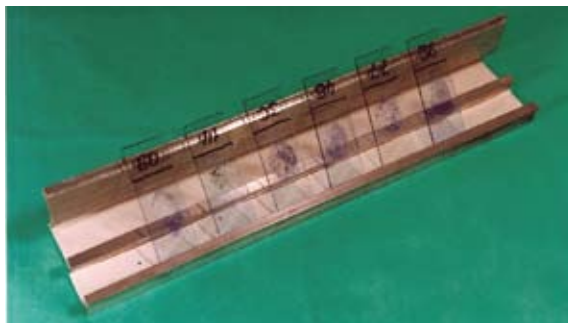


Рис. 12. Способ высушивания препаратов

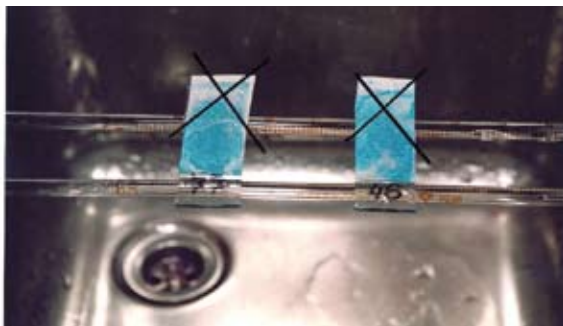


Рис. 13. Не промокать препараты!

При проведении процедуры обесцвечивания мазков следует помнить о том, что нельзя уменьшать время экспозиции с раствором серной кислоты или солянокислого спирта. Кроме того, рекомендуется визуально оценивать степень обесцвечивания мазка, добиваясь эффекта полного обесцвечивания (до исчезновения красного цвета). При необходимости (неполное обесцвечивание мазка) следует провести повторное обесцвечивание.

Поскольку сапрофитные виды микобактерий значительно менее устойчивы к обесцвечиванию, чем патогенные штаммы, допускается проводить последовательное двойное обесцвечивание мазков: первоначально 25% серной кислотой в течение 3 минут, а затем – 96% этиловым спиртом в течение 5 минут. Столь жесткий режим обесцвечивания позволяет избежать гипердиагностики КУМ.

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 «скрыть» кислотоустойчивые микобактерии.

В том случае, если произошло загрязнение краской нижней, свободной от мазка поверхности предметного стекла, следует аккуратно протереть ее перед микроскопией тампоном, смоченным солянокислым спиртом.

Препарат микроскопируют с масляной иммерсией в световом микроскопе.

12.2. Окраска препаратов для люминесцентной микроскопии

Окраска мазков люминесцентным методом чаще всего используется в бактериологических лабораториях специализированных противотуберкулезных учреждений и является альтернативой унифицированному методу окраски по Цилю–Нильсену.

Люминесценция – это свечение объектов. Метод основан на наблюдении светящихся микроскопических объектов на общем темном фоне препарата. По сравнению с методами световой микроскопии в проходящем свете он обладает рядом преимуществ: высокая степень контрастности цветных светящихся объектов на темном фоне, значительно большая площадь поля зрения и др.

Суть люминесцентной микроскопии заключается в том, что объекты (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 (видимой части излучения), иначе говоря – светиться. В этом случае клетка становится источником света определенного спектра (цвета) и хорошо видна на общем темном контрастном фоне препарата.

При обработке диагностического материала препарата люминесцентными красителями (аурамин О, родамин С и др.), которые связываются с воскоподобными структурами микробной клетки, последующее облучение препарата возбуждающим источником света (определенный спектр ультрафиолетового излучения) вызывает оранжевое или ярко-желтое свечение окрашенных клеток микобактерий 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 250–450×, тогда как окрашенные фуксином – при увеличении 800–1000×. Разница в увеличении позволяет микроскописту видеть в люминесцентном микроскопе 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 Цилю–Нильсену составляет приблизительно 10–15 минут, то для исследования той же площади мазка методом люминесцентной микроскопии потребуется только 2–3 минуты.

Наряду с этим при люминесцентной микроскопии отмечается значительно большая резкость и контрастность микроскопической картины, что повышает комфортность микроскопического исследования. Для глаза исследователя намного 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 ярком голубом фоне клеточного детрита при окраске по Цилю–Нильсену. Это делает метод люминесцентной микроскопии особенно ценным при исследовании олигобациллярного материала. Чувствительность люминесцентной микроскопии, особенно в сочетании с методом обогащения диагностического материала (микроскопия осадка), приближается к чувствительности метода посева.

Указанные преимущества позволяют использовать люминесцентную микроскопию в лабораториях, выполняющих ежедневно большое число исследований (порядка 30 и более), в целях ускорения процедуры микроскопии.

Мазки для люминесцентной микроскопии следует готовить после обработки материала детергентом с последующим отмыванием и центрифугированием осадка при 3000 g в антиаэрозольной рефрижераторной центрифуге. Перед нанесением материала осадка на предметное стекло необходимо проверить уровень *pH* осадка материала и добиться его нейтрального значения *pH* (6,8–7,0). С этой целью осадок нейтрализуют, добавляя к нему в зависимости от метода обработки материала либо несколько капель 10% раствора соляной кислоты (при обработке материала щелочью), либо несколько капель 6% раствора едкого натра (при обработке материала кислотой). После добавления нейтрализующего раствора необходимо тщательно перемешать осадок. Затем с помощью бумажной индикаторной полоски определить уровень *pH*. После получения оптимального уровня *pH* (6,8–7,0)

осадок может быть использован для приготовления мазка. Эта особенность приготовления мазка не позволяет использовать люминесцентную микроскопию для исследования нативного материала.

При использовании объектива с меньшим увеличением существует вероятность получения ложноположительных результатов. Поэтому во всех сомнительных случаях микроскопической картины для контроля (подтверждения кислотоустойчивости выявленных в препарате микроорганизмов) следует провести микроскопию мазка, повторно окрашенного по методу Циля–Нильсена.

12.3. Хранение приготовленных препаратов

Приготовленные 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 мазка, а также перекрестной контаминации мазков. Положительные и отрицательные стекла рекомендуется хранить в коробках в том порядке, в каком проводилось исследование.

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

Все положительные стекла с мазками, окрашенными методом Циля–Нильсена, хранят 1 год и более, если больной находится это время в стационаре.

В случае невозможности длительно сохранять в лаборатории все стекла с отрицательными мазками для внешней оценки качества следует сохранять не менее 10% последних.

13. ТЕХНИКА МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ

13.1. Оборудование и реактивы для проведения микроскопического исследования препаратов, окрашенных по методу Циля–Нильсена

Типовое рабочее место для проведения микроскопического исследования мазков, окрашенных методом Циля–Нильсена, представлено на рис. 14.

Для проведения такого исследования необходимы:

- бинокулярный микроскоп;
- иммерсионное масло (синтетическое);
- капельница для нанесения масла на препарат;
- штатив с окрашенными и высушенными мазками, которые должны быть расположены в порядке номеров регистрации;
- емкость с ксилолом (или толуолом), спирто-эфирной смесью или 96% этиловым спиртом;
- фильтровальная бумага для удаления иммерсионного масла с поверхности просмотренного препарата;
- ватные шарики;
- мягкая хлопчатобумажная ткань или специальные салфетки для протирания линз микроскопа;
- коробки для хранения просмотренных мазков;
- бумага и ручка для записи результатов микроскопического исследования;
- емкость с дезинфицирующим средством.

Для исследования мазков, окрашенных по Цилю–Нильсену, используют световой бинокулярный микроскоп с иммерсионным объективом 90× или 100× и окуляром 7× или 10× (рис. 15).



Рис. 14. Организация рабочего места для проведения микроскопии с окраской по Цилю–Нильсену

13.2. Порядок подготовки микроскопа для проведения микроскопического исследования



Рис. 15. Общий вид светового бинокулярного микроскопа

Современные микроскопы являются сложными техническими устройствами, чувствительными к настройке и соблюдению правил эксплуатации. Перед началом работы они должны быть настроены и адаптированы под особенности зрения микроскописта. Лучше поручить это инженерной службе, но можно провести настройку и самостоятельно, используя рекомендации по настройке и эксплуатации микроскопа (см. **Приложение № 2** настоящего Руководства). Несоблюдение правил настройки может привести к существенному снижению эффективности микроскопических исследований.

Исследование мазков, окрашенных по методу Циля–Нильсена, производится в проходящем свете с помощью светового микроскопа. Исследование рекомендуется производить с помощью бинокулярного микроскопа.

Перед началом исследования следует:

- проверить наличие на столе для микроскопии необходимого для проведения микроскопического исследования оборудования и дополнительных материалов (рис.14; **Приложение 1**);
- снять полиэтиленовый или пластиковый 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 специальной салфетки для линз или мягкой фланелевой ткани, слегка смоченной в специальной жидкости, рекомендуемой фирмой – изготовителем микроскопа для чистки линз, протереть линзы микроскопа. Как правило, для этих целей рекомендуется использовать ксилол (ксилен), но могут быть использованы и другие жидкости, если это оговорено в инструкции по эксплуатации микроскопа;
- 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;
- вращая винт грубой фокусировки (макровинт), опустить предметный столик, отдалив его от объектива;
- поворотом револьверного устройства установить объектив с малым увеличением (8× или 10×) точно над конденсором;
- поместить на столик предметное стекло таким образом, чтобы мазок находился прямо под объективом; при этом **обязательно убедиться, что мазок находится на верхней поверхности предметного стекла, а не снизу;**
- закрепить препарат на столике с помощью клемм или препаратоводителя;
- с помощью винтов препаратоводителя выбрать участок препарата для начала просмотра – для светового микроскопа это может быть наиболее интенсивно окрашенный участок препарата;
- раздвинуть окуляры бинокулярной насадки 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!**
- при работе со световым микроскопом, 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 конденсора. **Положение конденсора не изменяют!** Может оказаться, что при малом увеличении поле зрения будет затемненным из-за перекрытия подсветки фокусирующей

- ной линзой конденсора. В этом случае ее нужно сдвинуть – вывести из тракта подсветки соответствующей рукояткой;
- продолжая смотреть через окуляр, **медленно** повернуть макровинт, чтобы предметный столик отошел от линзы объектива. Обычно для получения изображения достаточно несколько поворотов винта; расстояние до указанных объективов составляет, как правило, 3–4 мм;
 - затем, глядя в окуляр, **медленно** вращать микровинт до тех пор, пока не появится изображение мазка. Небольшими поворотами микровинта настроить изображение до получения достаточной резкости;
 - глядя правым глазом в правый окуляр, сфокусировать изображение;
 - глядя левым глазом в левый окуляр, сфокусировать изображение путем поворота дополнительного фокусирующего кольца, расположенного на тубусе левого окуляра.

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

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;
- поворотом револьверного устройства переместить выбранный объектив, установив его непосредственно над препаратом. При этом мазок должен оставаться почти в фокусе объектива; если до этого при настройке или работе дополнительная сдвигная линза конденсора была выведена из тракта освещения, ее необходимо вернуть в рабочее положение;
- с помощью микровинта сфокусировать резкость изображения.

Настройка света существенно улучшает качество изображения и необходима для правильной оценки препарата.

Все манипуляции по смене объективов проводятся при сфокусированном микроскопе. При настройке объект должен быть выведен из поля зрения.

Работа с объективом масляной иммерсии

Порядок работы

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

2. Поворотом револьверного устройства сместить сухой объектив так, чтобы доступ к препарату стал свободным.
3. Нанести на выбранный участок препарата одну каплю иммерсионного масла. Капля должна свободно упасть на стекло.
Пипетка или капельница масла ни в коем случае не должна соприкоснуться с мазком! Это может привести к переносу микобактерий с одного мазка на другой, загрязнению иммерсионного масла и получению ложноположительных результатов микроскопического исследования.
4. Поворотом револьверного устройства переместить объектив с сильным увеличением (90–100×) и установить его непосредственно над препаратом.
5. Глядя сбоку, медленно вращая макровинт грубой фокусировки, поднять столик микроскопа **до появления мениска** в момент соприкосновения фронтальной линзы объектива с поверхностью капли масла.
Никогда не допускайте соприкосновения линзы с предметным стеклом. Это может повредить линзу или разбить препарат.
6. Глядя в окуляр, с помощью винтов грубой и точной регулировки произвести настройку на резкость. Во время выполнения этой манипуляции **будьте особенно внимательны и смещайте винты на небольшой ход**, не допуская бесконтрольно полного оборота винтов.

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

13.3. Порядок проведения микроскопического исследования препаратов

При микроскопическом исследовании мазка, окрашенного по Цилю-Нильсену, необходимо дать количественную оценку препарату.

При значительном количестве в препарате кислотоустойчивых микобактерий достаточно исследовать 20–50 полей зрения (при этом количество исследуемых полей варьируется в зависимости от количества КУМ, обнаруживаемых в каждом из просматриваемых полей зрения – см. табл. 2). Так, при обнаружении в каждом из просматриваемых полей зрения более 10 КУМ, допускается просмотреть 20 полей зрения; при обнаружении в каждом поле зрения от 1 до 10 КУМ достаточно исследовать 50 полей зрения.

При меньшем количестве обнаруживаемых КУМ – от 10 до 99 в препарате – необходимо просматривать 100 полей зрения.

При наличии в исследуемом препарате единичных микобактерий для их обнаружения следует просматривать не менее 100 полей зрения.

В том случае, если результат исследования 100 полей зрения оказывается отрицательным, для его подтверждения рекомендуется просматривать дополнительно от 100 до 200 полей зрения, чтобы в случае конечного отрицательного результата было просмотрено не менее 300 полей зрения (табл. 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 (рис. 16):

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

Исследовать препарат начинают с поля зрения, выбранного в левом верхнем участке мазка, 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 в 1000 раз, т. е. при использовании для микроскопии масляно-иммерсионного объектива 100× и окуляра 10×, при исследовании одной длины мазка (≈ 20 мм) за один продольный проход просматривается около 100–120 полей зрения (диаметр поля зрения – $0,16 \div 0,2$ мм).

Перед просмотром каждого препарата необходимо заново протереть иммерсионную линзу чистой салфеткой для линз либо мягкой фланелевой тканью, слегка смоченной в ксилоле или другой специальной жидкости для чистки линз, рекомендуемой фирмой – изготовителем микроскопа.

По окончании микроскопического исследования каждого препарата следует:

- освободить препарат от механических держателей – клемм или препаратоводителя;
- сверить идентификационный номер препарата и записать результат на специальном листе бумаги с предварительно нанесенными порядковыми номерами препаратов;
- удалить с препарата иммерсионное масло;
- поместить препарат в коробку для хранения мазков.

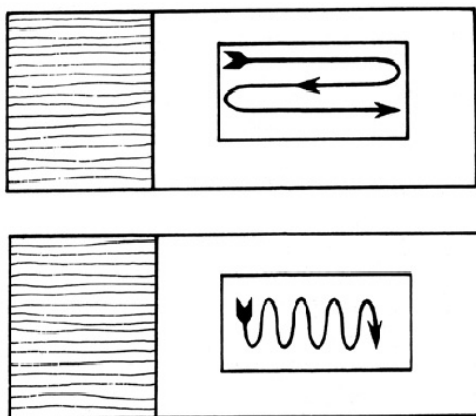


Рис. 16. Схема просмотра препаратов под микроскопом

При большом количестве исследуемых препаратов рекомендуется производить удаление иммерсионного масла одновременно со всех просмотренных препаратов или их части по окончании процесса микроскопического исследования. С этой целью следует:

- разложить препараты на покрытый фильтровальной бумагой поднос (лоток);
- поместить лоток в вытяжной шкаф;
- для удаления иммерсионного масла накрыть каждый препарат плоской фильтровальной бумаги;
- нанести на бумагу 1–2 капли ксилола, спирто-эфирной смеси или 96% этилового спирта;
- через 2–3 минуты фильтровальную бумагу удалить.

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

- протереть линзы микроскопа с помощью специальной салфетки для линз или мягкой фланелевой ткани, слегка смоченной в ксилоле или другой жидкости, рекомендуемой фирмой – изготовителем микроскопа;
- опустить предметный столик микроскопа, отдалив его от объективов;
- уменьшить интенсивность освещения и выключить источник освещения микроскопа;
- покрыть 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 с листа в лабораторный регистрационный журнал и на бланки ответов, предварительно заполненные до начала микроскопии (**Приложение 3**).

13.4. Морфологические характеристики кислотоустойчивых микобактерий при окраске по методу Циля–Нильсена

Кислотоустойчивые микобактерии обычно выявляются в виде тонких, изящных, прямых или слегка изогнутых неподвижных палочковидных микроорганизмов, окрашенных в малиново-красный цвет (рис. 17). Они имеют в длину примерно 1–10 мкм, в ширину – 0,2–0,6 мкм. При качественной окраске карболовым фуксином в микобактериях туберкулеза можно обнаружить различное количество гранул более плотной окраски. Микроорганизмы, располагающиеся поодиночке, парами или в виде групп, хорошо выделяются на голубом фоне других компонентов препарата. Нередко в нативных препаратах бактериальные клетки могут располагаться в виде римской цифры V, встречаются изогнутые и извитые варианты.

Внутри отдельных микробных клеток могут обнаруживаться участки более интенсивного окрашивания, в результате чего они похожи на бусы, а более слабо окрашенные участки могут иметь вид бледных полос.

В препарате могут выявляться также измененные коккоподобные кислотоустойчивые формы возбудителя, округлые сферические или мицелие-подобные структуры. Однако в случае обнаружения измененных форм кислотоустойчивых микроорганизмов положительный ответ должен быть подтвержден дополнительными методами исследования. Учет результатов ведут по типичным формам микобактерий.

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 кислотоустойчивости они приобретают фиолетово-малиновый цвет.

14. ПРИЧИНЫ ОШИБОК ПРИ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

14.1. Ошибки при выполнении лабораторных процедур

14.1.1. Причины ложноположительных результатов

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.

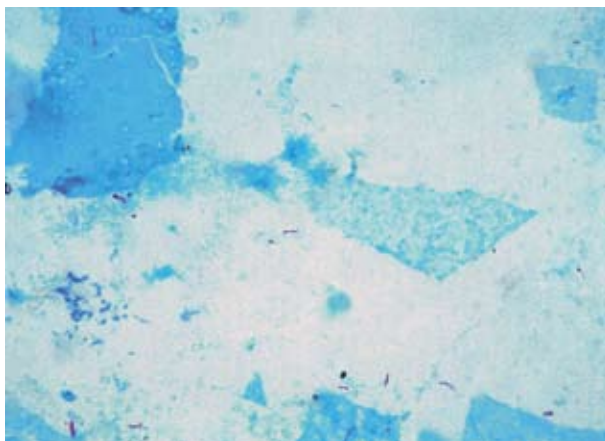


Рис. 17. Примеры типичных форм микобактерий туберкулеза при окраске по Цилю–Нильсену. Увеличение 1000×

- Использование для приготовления мазка загрязненного бактериологических петель, пипеток или деревянных палочек.
- Использование 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 кислотоустойчивые микобактерии. Такие царапины нередко образуют парал-

- лельные ряды. Обычно они более грубые и большего размера, чем микобактерии.
- Неудовлетворительное качество реактивов, в частности использование плохо профильтрованного или длительно хранившегося раствора фуксина, содержащего кристаллы красителя.
 - Окрашивание одновременно слишком большого количества мазков. При этом возможны перетекание растворов с одного мазка на другой и перекрестная контаминация мазков.
 - Наличие микобактерий в иммерсионном масле, если иммерсионные линзы не были очищены после положительных препаратов или если иммерсионное масло загрязнено микобактериями (в том случае, когда пипетка, которой масло 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 палочек, по морфологии напоминающих кокки.

14.1.2. Причины ложноотрицательных результатов

Ложноотрицательные результаты могут быть обусловлены следующими причинами.

- Плохое качество или недостаточное количество исследуемого материала.
- Исследование слюны вместо мокроты.
- Длительное (более недели) хранение материала в условиях высокой температуры и низкой влажности, а также воздействие на материал прямого солнечного света или ультрафиолетового излучения. Под влиянием этих факторов содержащиеся в материале кислотоустойчивые микобактерии могут утратить присущую им кислотоустойчивость.
- Неудачный выбор частиц мокроты для приготовления мазка.
- Приготовление слишком тонкого или толстого мазка, плохая его фиксация над пламенем горелки или несоблюдение режима окрашивания (неправильная экспозиция).
- Перегрев мазка во время фиксации (если стекло слишком тонкое).

- Нарушение методики просмотра мазка (недостаточное число просмотренных полей зрения).
- Плохое качество красителей и реагентов.
- Хранение окрашенных мазков в месте, доступном прямым солнечным лучам или ультрафиолетовому свету, парам кислот.
- Использование микроскопа без должной настройки освещения или использование слабых объективов.
- Аберрации изображения в результате различных повреждений оптических частей микроскопа.
- При повторном просмотре мазков (реанализ) ложноотрицательный результат может быть обусловлен тем, что:
 - после первичного просмотра препарата не было удалено иммерсионное масло (при длительном воздействии оно ослабляет интенсивность окраски);
 - препарат тщательно протирали при удалении иммерсионного масла, что вызвало повреждение мазка (удаление части мазка с бактериальными клетками);
 - предназначенные для повторного исследования мазки длительно хранились в местах, доступных прямому солнечному или ультрафиолетовому свету.

14.2. Операторские ошибки (ложноположительные или ложноотрицательные)

Возможные причины таких ошибок:

- неправильная маркировка флаконов с диагностическим материалом;
- отсутствие маркировки на стекле или повреждение ее в процессе окраски или обесцвечивания;
- неправильная регистрация результатов;
- ошибочные записи при переносе результатов исследования в регистрационный журнал или в бланки ответов;
- усталость микроскописта при большом числе просматриваемых мазков в день.

14.3. Ошибки, вызванные неисправностью техники

Возможные причины неисправностей, возникающие при проведении микроскопического исследования, представлены в табл. 1.

Возможные причины неисправностей при проведении микроскопического исследования 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 контаминированы грибами На линзах окуляра имеются царапины	Протереть окуляр Необходим ремонт окуляра Заменить окуляр
Невозможно обнаружить материал на стекле Недостаточно четкое изображение	Перевернут препарат (мазок находится снизу стекла) В масле находится пузырек воздуха Плохое качество масла Загрязнены линзы объектива	Перевернуть предметное стекло, поместив мазок сверху Передвинуть 100× объектив или, протерев его, заново установить Заменить масло, убедившись в его качестве Протереть линзы ксилолом, проверить чистоту линз изнутри
Нечеткое изображение при малом увеличении	Поверхности линз загрязнены маслом На поверхности линз может быть грязь Возможно повреждение линз Дополнительная линза конденсора находится в рабочем положении	Очистить линзы Очистить линзы Заменить поврежденные линзы Вывести дополнительную линзу из тракта подсветки соответствующей рукояткой

15. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

15.1. Учет результатов микроскопического исследования при окраске по методу Циля–Нильсена

Количество кислотоустойчивых микобактерий (МБ или КУМ), обнаруживаемых при микроскопическом исследовании, является очень важным инфор-

мационным показателем, так как во многих случаях оно коррелирует со степенью эпидемической опасности больного и тяжестью заболевания. Поэтому результат микроскопического исследования должен быть не только качественно, но обязательно и количественно охарактеризован.

При использовании объектива 90× или 100× и окуляра 7–10× (общее увеличение 630–1000) применяется следующая градация результатов световой иммерсионной микроскопии (табл. 2).

Таблица 2

**Градация результатов микроскопического исследования
при окраске по методу Циля–Нильсена**

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 на 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

Примечание: * – 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.

15.2. Регистрация результатов микроскопического исследования

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

- порядковый лабораторный номер;
- дату проведения исследования;
- фамилию и инициалы пациента;
- пол;

- год рождения;
- полный адрес фактического места жительства пациента;
- название медицинского учреждения и/или его подразделения, направившего материал на исследование;
- материал исследования;
- цель проведения исследования (диагностика или мониторинг результатов химиотерапии, другое); при обследовании больного туберкулезом в процессе химиотерапии в графу «контроль химиотерапии» вписывается региональный регистрационный номер больного туберкулезом;
- номер пробы материала (учет кратности обследования);
- результат микроскопического исследования;
- подпись ответственного лица;
- замечания по качеству материала.

Положительные результаты исследования рекомендуется вписывать в журнал **красными чернилами**.

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

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

Кроме вышеуказанных регистрационных параметров (см. **Приложение 3** – лабораторный журнал регистрации), которые заносятся в лабораторный регистрационный журнал, в бланке ответа на микроскопическое исследование также должны содержаться следующие сведения:

- даты проведения исследований;
- среднее количество кислотоустойчивых микобактерий в мазке;
- выявление больших скоплений микроорганизмов, что может свидетельствовать о гораздо большем количестве бактерий, чем указано в заключении;
- дата выдачи результатов;
- фамилию сотрудника, проводившего анализ.

Результат следует отправлять в медицинское учреждение, пригласившее пробы.

Никогда не ограничивайтесь выдачей результата пациенту!

16. ОБУЧЕНИЕ ПЕРСОНАЛА КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

Микроскопические исследования по выявлению возбудителя туберкулеза отличаются от обычной работы КДЛ ОЛС. В первую очередь, это определяется особенностями возбудителя, а во-вторых – многоступенчатой системой организации диагностических мероприятий. В силу этого обеспечение качества лабораторных исследований является важнейшей задачей *всей* лабораторной службы. Оно в значительной степени обеспечивается квалификацией персонала, постоянным повышением его методического уровня, а также сознательным отношением к проводимым исследованиям. Эти особенности должны учитываться при разработке программ обучения персонала лабораторий.

При выполнении исследования сотрудники лабораторий должны сознавать важность своей роли в борьбе с туберкулезом и чувствовать себя полноправными партнерами, участвующими в выполнении Федеральной программы. В связи с этим при обучении лабораторных работников методам микроскопической диагностики необходимо подчеркивать их важную роль в выявлении наиболее эпидемически опасной категории больных туберкулезом.

Особое внимание должно быть обращено на инструктаж персонала лаборатории по соблюдению санитарно-эпидемиологического режима и техники безопасности при организации и проведении исследований.

Врачи и лаборанты клиничко-диагностических подразделений, участвующие в проведении микроскопических исследований по выявлению кислотоустойчивых микобактерий, помимо предусмотренных Российским законодательством и Приказами МЗ и СР РФ регулярных курсов повышения квалификации и переподготовки медицинского персонала клиничко-диагностических лабораторий должны получить специальную подготовку по вопросам организации и методического обеспечения качественного и своевременного выполнения всего комплекса исследований по выявлению кислотоустойчивых микобактерий:

- эпидемиологические особенности туберкулеза, его отличие от острых инфекционных заболеваний:
 - эпидемиологические показатели,
 - этиология туберкулеза и микобактериозов,
 - биология и основные свойства возбудителя туберкулеза и микобактериозов;

- роль микроскопических исследований в выявлении больных туберкулезом:
 - методы диагностики туберкулеза,
 - микроскопия – один из важнейших методов,
 - взаимосвязь лабораторий противотуберкулезных учреждений и общей лечебной сети;
- организация помещений и рабочих мест для проведения исследований:
 - оснащение, необходимое для проведения микроскопического исследования,
 - реактивы и расходные материалы, необходимые для проведения исследования,
 - правила работы со световым микроскопом;
- обеспечение качества всех этапов исследования и лабораторных процедур:
 - правила сбора, хранения и транспортировки диагностического материала,
 - правила приема и оценка качества диагностического материала,
 - правила приготовления мазков из нативного материала и из осадка,
 - метод окраски мазков для выявления кислотоустойчивых микробактерий при световой микроскопии;
- правила регистрации образцов материала;
- требования к проведению исследований:
 - микроскопия мазков и количественная оценка результатов микроскопического исследования,
 - регистрация результатов исследований и своевременное доведение их до лечебных подразделений,
 - микроскопическая техника, уход за ней, контроль ее технического состояния;
- обеспечение безопасности работ:
 - меры безопасности при работе с диагностическим материалом,
 - меры безопасности при работе с реагентами и расходными материалами,
 - дезинфекция и уничтожение зараженных материалов;
- контроль качества исследований:
 - меры по поддержанию качества работы лаборатории,
 - внутрилабораторный контроль качества,
 - внешний контроль качества исследований,

- Федеральная система внешней оценки качества клинических лабораторных исследований.

За организацию и проведение учебных курсов для сотрудников КДЛ всех районов отвечают вышестоящие организации, в лице главного внештатного лаборанта региона, в сотрудничестве с микробиологическими лабораториями противотуберкулезных учреждений.

Курс обучения должен носить практический характер и продолжаться не менее пяти дней. Учитывая специфику обучающего курса, на одного преподавателя должно приходиться не более 5–6 человек обучающихся. Слушатели должны быть обеспечены оборудованием, и прежде всего микроскопами (в том числе демонстрационным), предназначенными для учебных целей, а также реагентами и средствами индивидуальной защиты.

17. ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Обеспечение качества лабораторных исследований является важнейшей задачей отдельных лабораторных подразделений и всей лабораторной службы. Все лабораторные исследования должны сопровождаться обязательными мероприятиями и процедурами, обеспечивающими их качество и достоверность.

Контроль качества – это обязательный процесс систематического и эффективного мониторинга текущей работы лаборатории, призванный обеспечить достоверность, точность и воспроизводимость результатов, получаемых в лаборатории. Контроль качества служит механизмом, с помощью которого лаборатории могут подтвердить уровень своей профессиональности, надежность полученных результатов и эффективность службы.

Обеспечение качества исследований – обязанность и ответственность всех сотрудников лаборатории.

Существуют два взаимосвязанных вида контроля качества лабораторных исследований: внутренний и внешний контроль. Оба вида контроля качества предполагают проведение постоянного мониторинга основных показателей работы лаборатории, своевременное выявление возникающих в работе методических ошибок и их немедленное устранение.

Наряду с постоянно осуществляемым внутренним и внешним контролем важным инструментом повышения качества лабораторной диагностики является инспекционный контроль, осуществляемый периодически путем кураторских визитов – посещений подведомственных лабораторных

подразделений специалистами профильных НИИ и противотуберкулезных учреждений. Указанный контроль проводится в соответствии с Приказом Минздрава РФ № 8 от 12.01.1999 г. «О введении в действие Положения о порядке инспекционного контроля за деятельностью клинико-диагностических и экспертных лабораторий в здравоохранении». Этот вид контроля наиболее эффективен, поскольку он осуществляется путем личного контакта куратора с работниками лаборатории.

17.1. Внутрिलाбораторный контроль качества микроскопических исследований

Внутрिलाбораторный, или внутренний, контроль качества микроскопических исследований позволяет осуществлять эффективное и систематическое внутреннее наблюдение за проводимой в лаборатории работой. В соответствии с Приказом Минздрава России № 45 от 07.02.2000 г. «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» этот контроль должны регулярно осуществлять лабораторные подразделения всех уровней независимо от их ведомственной принадлежности.

Внутрिलाбораторный контроль качества выполнения исследований направлен на получение результатов, отвечающих заданным характеристикам метода: **чувствительности, специфичности, а также достоверности и воспроизводимости.**

Каждый сотрудник лаборатории несет ответственность за проведение внутреннего контроля качества.

Внутрिलाбораторный контроль качества осуществляется на всех технологических этапах микроскопического исследования и включает в себя:

- оценку качества поступающих проб;
- контроль за соблюдением рецептуры и методики приготовления реагентов и красителей;
- контроль за соблюдением методических приемов:
 - при приготовлении мазков (включая качество предметных стекол),
 - окраске мазков,
 - проведении микроскопического исследования,
 - 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;
- использования регламентированного оборудования:
 - настройки оборудования,
 - правил его эксплуатации;
- микроскопирования положительных и отрицательных контрольных образцов, приготовленных в данной лаборатории;
- своевременности и точности передачи результатов в учреждение, направившее материал для исследования.

Успех применения контроля качества обеспечивается:

- наличием средств контроля качества проводимых лабораторных и исследовательских процедур:
 - наличие соответствующих рабочих журналов (например, журнал по приготовлению растворов красителей с указанием рецептуры и производителя реагентов, журнал контроля качества окраски, журнал профилактики приборов и т. д.),
 - наличие записей и отметок, предусматривающих оценку качества выполнения процедуры или этапа исследования (например, качество собранной мокроты, время отправки и доставки материала и т. д.);
- регулярным его применением в лабораторном подразделении;
- наличием заинтересованных и ответственных высококвалифицированных специалистов, имеющих сертификат об обучении, выданный ведущими противотуберкулезными учреждениями РФ;
- рациональным применением регламентированных методов;
- регулярным (ежемесячным) анализом обобщенных данных, выяснением отклонений и допущенных ошибок и немедленным их исправлением, а также обсуждением имеющихся проблем с куратором лаборатории.

Одной из форм внутрилабораторного контроля качества бактериоскопических исследований является исследование в ряду подлежащих окраске клинических мазков двух дополнительных фиксированных, не окрашенных контрольных мазков, один из которых заведомо является положительным, а второй – отрицательным. Просмотр мазков начинают с контрольных. Бактериоскопия контрольных мазков должна подтвердить присутствие стандартно окрашенных микобактерий в позитивном мазке и их отсутствие –

в негативном. Только при этих условиях исследователь может быть уверен в качестве приготовленных мазков и в правильности осуществления процедуры их окраски, после чего может приступить к бактериоскопии клинических мазков.

Результаты просмотра контрольных мазков необходимо фиксировать в специальном журнале. В случае если качество контрольного мазка является неудовлетворительным, следует выявить и устранить причины низкого качества контрольных препаратов. Действия по исправлению причин низкого качества и результат микроскопии контрольных мазков после их исправления также должны быть отражены в журнале контроля качества.

Для учета нагрузки лаборатории и эффективности выявления больных туберкулезом в данном медучреждении необходимо ежемесячно учитывать число обследованных и выявленных больных, а также число проведенных исследований и положительных мазков.

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 нескольких положительных результатов подряд необходимо внимательно проанализировать причины этого.

17.2. Внешняя оценка качества микроскопических исследований

Прямой контроль качества каждого исследования в лаборатории невозможен, так как истинная величина исследуемого компонента в пробе материала, полученной от больного, неизвестна. Однако точность и правильность техники выполнения анализа можно контролировать двумя путями:

- с помощью унифицированных наборов аттестованных закодированных контрольных образцов;
- путем выборочного повторного анализа исследованных лабораторией образцов в курирующих лабораториях;
- путем очного инспекционного контроля на рабочем месте.

Образцы биологических препаратов, именуемые в зависимости от их квалификации стандартными, эталонными, контрольными и пр., имеют ряд преимуществ перед другими способами контроля.

Как правило, их можно изготовить в относительно больших количествах, что позволяет применять их сразу во многих лабораториях, обеспечивая

в течение длительного времени единство измерения. Кроме того, образцы готовятся идентичными анализируемым материалам, что уменьшает погрешности, обусловленные несоответствием контрольных образцов и анализируемых проб.

Одной из наиболее эффективных форм контроля качества являются кураторские визиты специалистов вышестоящих противотуберкулезных учреждений в подведомственные лаборатории. Во время такого визита имеется возможность на месте выявить ошибки в работе и их причины и принять меры к их устранению. Каждый визит куратора в лабораторию является дополнительным индивидуальным обучением персонала лаборатории методам качественной и безопасной работы, организации работы лаборатории.

17.2.1. Внешняя оценка качества микроскопических исследований с использованием контрольных образцов

В целях обеспечения должного уровня качества лабораторных клинических исследований в Российской Федерации функционирует Федеральная система внешней оценки качества клинических лабораторных исследований (ФСВОК), которая охватывает большинство видов исследований, выполняемых в лабораториях медицинских организаций.

Целью ФСВОК является оказание помощи лабораториям здравоохранения в обеспечении качества выполняемых исследований путем предоставления информации о правильности получаемых результатов, рекомендаций по устранению источников выявляемых ошибок и совершенствованию используемых методик. С этой целью в лаборатории периодически (от одного до трех раз в год в зависимости от вида исследования) рассылаются контрольные образцы и оцениваются результаты их исследования. С целью исключения подмены административными санкциями помощи, необходимой лабораториям в обеспечении качества выполняемых исследований, в ФСВОК соблюдается конфиденциальность результатов оценки качества исследований конкретной лаборатории. Последние направляются только ее заведующему под кодом данной лаборатории.

Оценка качества микроскопического выявления КУМ в ФСВОК осуществляется Центром внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований (ЦВКК) в сотрудничестве с федеральными и межрегиональными бактериологическими лабораториями ведущих научно-исследовательских и других противотуберкулезных учреждений (ЦНИИ туберкулеза РАМН, НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрав-

соцразвития РФ, Уральский НИИ фтизиопульмонологии Минздравсоцразвития РФ, Новосибирский НИИ туберкулеза Минздравсоцразвития РФ, республиканские и областные противотуберкулезные диспансеры). Дважды в год участникам ФСВОК направляются наборы, составленные из 8–10 отрицательных и разнонагруженных положительных контрольных препаратов. По результатам исследования этих препаратов проводится оценка качества исследования лабораторией клинических препаратов, даются рекомендации по его совершенствованию. Участие в ФСВОК является одним из обязательных видов деятельности клинико-диагностических и бактериологических лабораторий по обеспечению требуемого качества выполнения микроскопических исследований. По итогам года ЦВКК представляет в Минздравсоцразвития РФ, а также в Федеральную и в межрегиональные курирующие лаборатории ПТС отчет о качестве микроскопического выявления КУМ в регионах и по стране в целом.

Деятельность ФСВОК предполагает возможность дополнительного исследования контрольных препаратов в одной из экспертных лабораторий в случае несогласия участника ФСВОК с результатами оценки.

Клинико-диагностические лаборатории, участвующие в системе внешней оценки качества лабораторной диагностики туберкулеза:

- проводят исследование контрольных образцов в сроки, указанные в сопроводительных документах;
- заполняют и отсылают необходимые документы в Центр внешнего контроля качества;
- после получения результатов оценки и рекомендаций ФСВОК анализируют имеющиеся проблемы совместно с куратором ведущего противотуберкулезного учреждения, а затем самостоятельно принимают меры для улучшения качества исследований, повышая профессиональные знания и навыки сотрудников лаборатории, проводя необходимую настройку приборов, их ремонт, профилактику и т. д.;
- по запросу курирующих лабораторий предоставляют им сведения по результатам внешней оценки качества для планирования курсов обучения и проведения необходимых мероприятий по оказанию консультативно-методической помощи, направленной на улучшение качества исследований;
- обеспечивают сохранность всех контрольных мазков в течение времени прохождения цикла оценки качества исследований до получения оценки результатов из ЦВКК.

Внешняя оценка качества микроскопического выявления микобактерий рассчитана на использование методов и оборудования, требования к которым определены Приказом № 109 от 21.03.2003. Если лаборатория не располагает требуемыми микроскопами, а работает с приборами, имеющими более низкие технические характеристики, она должна указать все реквизиты используемых приборов и особенно тщательно отнестись к заполнению сопроводительных документов, так как это требует учета при оценке результатов исследования контрольных мазков.

По условиям работы ФСВОК все присланные контрольные препараты должны анализироваться лабораторией в штатном порядке для исключения особого подхода к их оценке.

17.2.2. 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. Эти правила служат для штатной проверки качества исследования клинических образцов.

Функции курирующей лаборатории может выполнять лаборатория противотуберкулезной службы или назначенный Центр микроскопии, имеющий для этого необходимую квалификационную специализацию, а также штатное и приборное обеспечение. Эти вопросы решаются в установленном порядке и относятся к компетенции главного внештатного лаборанта области, главного внештатного фтизиатра области, территориального комитета здравоохранения.

Лаборатория должна соблюдать правильность хранения препаратов, обеспечивая их целостность и исходное качество, при котором получен результат. Препараты должны иметь полную и стойкую маркировку и сопровождаться соответствующими документами.

Для получения статистически достоверной оценки качества исследований необходимо соблюдать следующие принципы организации повторного анализа.

- Выборка мазков для повторного анализа должна осуществляться не самой лабораторией, а куратором данной лаборатории в ходе проведения ежеквартального кураторского визита. В связи с этим все мазки должны храниться в лаборатории до проведения куратором выборки их части для повторного анализа.

- Пересмотр мазков в курирующей лаборатории должен осуществляться «слепым» методом, то есть положительные и отрицательные мазки должны располагаться в одном наборе, в порядке номеров. Референс-микроскопист не должен знать результатов исследования этих мазков в контролируемой лаборатории.
- При проведении повторного анализа референс-микроскопистом определяется правильность количественной оценки мазка, проводится оценка качества его приготовления и окраски, а также оценивается диагностический материал, из которого приготовлен мазок (слюна или мокрота).

Качество работы контролируемой лаборатории считается неудовлетворительным, если среди мазков, подвергнутых проверке, обнаружено более 10% мазков с неудовлетворительным окрашиванием или качеством приготовления мазка, ложноположительные мазки или более 5% ложноотрицательных мазков. Если в перепроверенных отрицательных мазках обнаружен хотя бы один мазок, оцененный референс-микроскопистом на 1+ и более, качество работы лаборатории также считается неудовлетворительным. При обнаружении более 10% мазков, приготовленных из слюны, организация обследования больных (качество сбора мокроты) считается неудовлетворительной.

В случае расхождения в оценке мазка референс-микроскопистом и контролируемой лабораторией обеспечивается просмотр этого мазка третьим микроскопистом. Истинным считается результат, полученный двумя микроскопистами.

Курирующая лаборатория должна заносить результаты работы по реанализу клинических образцов в отдельный журнал и информировать учреждение и проверяемую лабораторию о результатах.

Все работы, связанные с проведением оценки качества исследуемых препаратов, должны учитываться при определении нагрузки лаборатории и регистрироваться в рабочих журналах.

17.2.3. 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.

Целью кураторских визитов является не только проверка качества исследований, соблюдение правил безопасности, но и оценка степени готовности лаборатории к чрезвычайным обстоятельствам, оценка системы внутрилабораторного контроля качества и оценка доступности обследования населения микроскопическими методами выявления КУМ.

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.

В ходе кураторских визитов уделяется внимание:

- правильному ведению лабораторного журнала и заполнению бланка ответа;
- оценке доли неудовлетворительно собранных образцов;
- соблюдению стандартных методов;
- правильности приготовления растворов;
- правильности хранения растворов и реактивов, срокам их годности;
- оценке качества мазков;
- рабочей нагрузке лаборатории;
- оценке гигиены и соблюдения мер безопасности;
- оценке эффективности внутрилабораторного контроля качества: проводится ли ежемесячная оценка доли положительных мазков по сравнению с нормой, регулярно ли исследуются контрольные отрицательные и положительные мазки.

Кроме того, куратор производит выборку образцов исследованных мазков для повторного анализа.

По результатам каждого визита куратор составляет справку о работе лаборатории по проведению исследований с целью выявления, диагностики и контроля химиотерапии туберкулеза. В оценочном отчете, как правило, бывают представлены как характеристики работы самой лаборатории, так и характеристики организации выявления больных в данном медучреждении. Последние часто не зависят от работников лаборатории, однако эти показатели значительно влияют на эффективность работы лаборатории.

В случае выявления ошибок в работе куратор должен оповестить руководителя лаборатории о выявленных проблемах. Руководитель лаборатории должен немедленно принять меры к их исправлению. Куратор может оказать помощь руководителю лаборатории в ликвидации проблем, влия-

ющих на качество исследования, и должен в кратчайшие сроки проверить результаты их исправления.

Результаты инспекционного контроля докладываются не только курируемой лаборатории, но и местному комитету здравоохранения. На их основе формируются управленческие решения. Кроме того, они являются частью паспортизации территорий.

18. ОРГАНИЗАЦИЯ И УПРАВЛЕНИЕ РАБОТОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Основными задачами лаборатории являются бесперебойное выполнение с заданным качеством лабораторных исследований, своевременное адресное информирование о результатах исследований, соблюдение безопасности работ. Соответственно, работа лаборатории должна быть построена таким образом, чтобы вовремя обнаруживать и исправлять возникающие ошибки при работе, обеспечить меры по устойчивой работе лаборатории, свести к минимальному риску инфицирование персонала и т. д. В силу этого при организации работы лаборатории должны выдерживаться определенные требования.

18.1. Устройство и режим работы лаборатории

Время приема материала должно быть таким, чтобы была реальная возможность собрать качественный диагностический материал. С другой стороны, недельный режим работы должен обеспечивать проведение гигиенических и санитарных мероприятий, качественное выполнение подготовительных лабораторных работ, подготовку отчетов и т. д. Обычно для этого назначают один рабочий день (пятница), в этот день материал не принимают.

Пример устройства лаборатории приведен в **разделе 6** (рис. 1) настоящего руководства. Во время работы двери в лабораторию должны быть всегда закрыты. Расположение рабочих зон, оборудования и реагентов должно быть постоянным – в соответствии с последовательностью выполнения работы и с соблюдением эпидемической 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 не менее двух раз в день (перед началом и после окончания работы) раствором действенного дезинфицирующего средства, например, 5% раствором хлорамина (см. **раздел 19.5**). Обеззаражива-

ющие приборы и оборудование должны использоваться в соответствии с инструкциями (см. **разделы 19.1; 19.2; 19.6**). Время работы таких устройств должно фиксироваться в отдельном *журнале работ дезинфицирующих устройств*, с тем чтобы можно было своевременно производить замену рабочих элементов. Эффективность ультрафиолетовых облучателей зависит от влажности и степени загрязненности воздуха и рабочих поверхностей, что необходимо учитывать при проведении санитарных гигиенических мероприятий в лаборатории. Перед работой должны быть включены необходимые вытяжные устройства.

У каждого рабочего места должны быть вывешены методические инструкции по проведению выполняемых на этом рабочем 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 двух лет, если другие сроки не определены рабочими инструкциями, нормативными документами и т. д.

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

18.2. Лабораторное оборудование

- Оборудование должно полностью удовлетворять стандартным требованиям и спецификациям, а также методическим требованиям.
- Технические паспорта на все оборудование и инструкции по применению оборудования и уходу за ним необходимо хранить в специальной папке.
- Оборудование должно регулярно проверяться инженерно-техническими службами для обеспечения точности и правильности его работы.
- Следует иметь отдельный журнал для регистрации профилактических осмотров всего оборудования.
- Сотрудники лаборатории должны быть обучены или самостоятельно изучить правила работы и эксплуатации приборов.

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

18.3. Правила организации рабочего места микроскописта

В отношении микроскопов предусматривается, что срок службы микроскопа определяется соответствующими инженерно-техническими службами с учетом естественного старения (не более 7–10 лет эксплуатации). Микроскоп является точным и дорогостоящим инструментом, поэтому требует очень бережного обращения – как с механической частью прибора, так и с оптикой. Для работы с микроскопом не обязательно знать устройство и работу микроскопа в деталях – этим должны заниматься профессионалы. Однако иметь основные представления о правилах работы с микроскопом, его эксплуатации и хранении необходимо. Детальное описание процедур настройки светового микроскопа и правил работы с ним изложены в **Приложении 2**, ниже приводятся положения, которые должны учитываться при организации рабочего места микроскописта и его правильной работы (см. также **Раздел 6**).

Место для проведения микроскопического исследования должно быть выбрано таким образом, чтобы оно исключало попадание прямого солнечного света на микроскоп (при использовании микроскопа со встроенным освещением). Поблизости не должны находиться те виды оборудования, которые вызывают вибрацию (например центрифуги), а также раковина для мытья рук или окраски препаратов; шкаф, где хранят кислоты и растворители.

Микроскоп должен быть установлен на прочной ровной поверхности. Лучше, если это будет специальный стол с регулируемыми ножками для выравнивания уровня поверхности. Если микроскоп используется каждый день, постарайтесь держать его на одном постоянном месте.

Большинство фирм, выпускающих микроскопы, прилагают к прибору правила его эксплуатации, которые содержат следующие сведения.

- Когда вы не пользуетесь микроскопом, храните его в футляре или накрывайте пластиковым чехлом.
- Избегайте избыточной влажности рядом с микроскопом.
- Для очистки объективов пользуйтесь специальными мягкими салфетками для линз, слегка смоченными в жидкости, рекомендованной фирмой – изготовителем микроскопа; для очистки окуляров используйте лабораторную грушу.
- Не храните микроскоп там, где находятся химические реактивы, кислоты, а также в помещениях или местах с высокой влажностью.

- Избегайте необоснованных частых передвижений микроскопа.
- Не следует допускать попадания иммерсионного масла на предметный столик микроскопа или другие объективы, кроме иммерсионного.
- После просмотра **каждого** препарата следует тщательно вытирать объектив от иммерсионного масла, чтобы предотвратить контаминацию следующего мазка и получение ложноположительных результатов.
- Никогда не разбирайте микроскоп; в случае появления какой-либо неисправности ремонт должен производиться только специалистом.

Микроскопист обязан приводить микроскоп в порядок ежедневно. Кроме того, микроскоп подлежит обязательной ежемесячной и полугодовой профилактике, которые проводятся специалистом (см. **Приложение 2**). Практика показывает, что по возможности следует рекомендовать использование одного микроскопа одним специалистом.

18.4. Исследуемый материал и бланки исследований

- Микроскопическое исследование проводится только при наличии письменного направления на исследование от уполномоченных лиц.
- По устной просьбе, не подтвержденной получением соответствующих документов, исследования не проводятся.
- Бланки направлений на исследование должны доставляться и храниться 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 проводить исследование безымянных проб или проб с неправильно оформленным направлением.
- При регистрации необходимо оценить качество пробы, чтобы отобрать и отделить пробы, содержащие слюну. Ответ может быть сформулирован следующим образом: «поступившая проба похожа на слюну – интерпретируйте отрицательный ответ с осторожностью». По возможности желательно удалять такие пробы и запрашивать новую (повторную) пробу материала.
- 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.

18.5. Реактивы и красители

- Все флаконы с реактивами и красителями заводского производства должны иметь отметку о дате получения и вскрытия заводской упаковки. Любые некачественные материалы следует специально пометить и немедленно удалять из лаборатории. К работе допускаются реагенты до истекшего срока их годности и с условиями хранения, обозначенными на этикетке. Особенно это относится к фенолу. Его сохранность повышается при хранении в холодильнике при 4–6 °С в герметичной емкости. Если фенол порозовел, или пожелтел, или он оплавился, то его не следует использовать. Следует быть крайне осторожным при использовании тех рабочих растворов, которые были приготовлены вне лаборатории (к примеру, в аптеке учреждения или другой КДЛ) и контроль качества которых вы не можете осуществить должным образом. Исключение составляют те случаи, когда реактивы централизованно изготавливаются в центральной или курирующей лаборатории.
- На складе следует иметь запас реактивов на 6 месяцев работы. Необходимо регулярно контролировать сроки годности препаратов и реактивов и обновлять запасы, чтобы не было материалов с истекшим сроком хранения.
- Приготовление растворов, реагентов, красителей и т. д. должно отмечаться в отдельном *рабочем журнале* или тетрадке, чтобы можно было проконтролировать навески, даты приготовления и т. д.

18.6. Окрашивание и исследование препаратов

- При окраске мазков:
 - не следует помещать на штатив («рельсы») и окрашивать одновременно более 12 стекол;

- **не следует проводить окраску или промывание препаратов, погружая их в емкости с растворами;**
- следует избегать соприкосновения стекол, которое может привести к затеканию краски с одного стекла на соседние и к переносу микобактерий с одного препарата на другой.
- При промывании мазков:
 - **не следует пользоваться резиновыми трубками или наконечниками для направления струи воды на препарат.** В окружающей среде и водопроводной воде содержится значительное количество кислотоустойчивых сапрофитов, которые легко размножаются на резиновых поверхностях в условиях повышенной влажности. Во время промывания мазков, при прохождении струи воды через загрязненные микобактериями резиновые трубки или наконечники, они могут попасть на препарат и обусловить ложноположительный результат анализа.
- При исследовании препаратов:
 - в число исследуемых мазков необходимо ежедневно включать контрольные положительные и отрицательные препараты, особенно если за 1 день просматривается менее 10 мазков;
 - вначале микроскопируются контрольные мазки, а затем – клинические.
- **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.
- По окончании микроскопического исследования необходимо:
 - удалить с препаратов иммерсионное масло и поместить их в специальную коробку, 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 часть мазка с окрашенными бактериальными клетками. Стекла устанавливаются в коробку вертикально, чтобы они не соприкасались и не загрязняли друг друга.

- все положительные и отрицательные стекла с мазками необходимо укладывать в коробки для сохранения в том порядке, в котором проводилось исследование, чтобы в дальнейшем можно было провести внешний контроль качества в соответствии с установленными правилами. Мазки должны иметь свой полный лабораторный номер.

18.7. Выдача ответов и администрирование

- Результаты микроскопического исследования следует передавать в медицинское учреждение или непосредственно врачу, направившему материал на исследование.
- Результаты бактериоскопии следует отсылать как можно быстрее – желательно в течение 24 часов с момента получения проб мокроты.
- Необходимо еженедельно и ежемесячно 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. Возможно, в этом случае имело место загрязнение мазков во время их приготовления, окраски или микроскопии.

19. ОБЕСПЕЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ РАБОТ И ГИГИЕНА ПОМЕЩЕНИЙ

В данном разделе представлена информация по обеспечению безопасности работ применительно, главным образом, к специализированным бактериологическим лабораториям противотуберкулезной службы.

Для КДЛ ОЛС, выполняющих исследования мазков методом Циля–Нильсена из необработанного материала и не работающих с культурой возбудителя туберкулеза, применимы менее строгие нормы, определяемые органами Госсанэпиднадзора. В связи с этим выполнение в КДЛ ОЛС в полном объеме всех представленных ниже требований по обеспечению биологической безопасности не является обязательным.

Тем не менее мерам обеспечения безопасности работы в КДЛ ОЛС желательно уделять повышенное внимание, в связи с чем приведенная ниже информация может быть принята к сведению и использована при организации работы по выявлению КУМ в КДЛ ЛПУ общего профиля.

19.1. Общие правила устройства лаборатории

Приведенные в Приказе Минздрава России №109 от 21.03.2003 инструкции по проведению микроскопических исследований для диагностики туберкулеза лабораториями КДЛ ОЛС предполагают существенное увеличение нагрузки по данному разделу работ. В связи с этим возрастает время контакта с инфицированным материалом и, соответственно, профессиональный риск лабораторных работников.

При организации исследований необходимо руководствоваться Федеральными санитарными правилами и нормами Российской Федерации и помнить, что к работе с возбудителем туберкулеза допускаются лаборатории, подготовленные для работы с микроорганизмами III—IV группы учета патогенности. Это связано с высокой трансмиссивностью микобактерий туберкулеза. Устройство лаборатории, расположение и организация рабочих мест должны предотвращать как развитие госпитальной инфекции, так и контаминацию рабочих мест, а также обеспечивать необходимые меры безопасности при работе персонала с возбудителем туберкулеза.

Необходимые мероприятия должны включать:

- 1) **административные** меры, предотвращающие распространение инфекционных аэрозолей из загрязненных зон в неинфицированные помещения лаборатории и лечебного учреждения в целом;
- 2) **инженерные** (проектные и технические) мероприятия, направленные на снижение концентрации инфекционных аэрозолей в воздухе (принудительная вентиляция, использование эффективных устройств обеззараживания воздуха путем фильтрации, облучения и др.);
- 3) меры **персональной** защиты органов дыхания персонала (защитные маски, респираторы).

Указанные меры приведены в последовательности убывания их эффективности. Например, персональная респираторная защита малоэффективна при отсутствии административных мер и мер, направленных на снижение концентрации инфекционных аэрозолей в воздухе.

Административные меры включают:

- разделение лаборатории на инфицированную зону, где происходят движение и обработка заразного материала, и неинфицированную зону с отдельным входом в каждую;
- создание эпидемической цепочки движения исследуемых материалов в процессе приема, обработки и исследования;

- соответствующее назначение помещений лабораторий; соблюдение норм санитарно-гигиенических мероприятий и выбор адекватных дезинфицирующих средств, имеющих документацию, разрешающую их применение для дезинфекции микобактерий туберкулеза;
- образовательную подготовку персонала, включающую ознакомление с особенностями трансмиссии микобактерий туберкулеза;
- соблюдение правил сбора материала (в первую очередь, мокроты);
- выбор методов, сокращающих время работы с заразным материалом и повышающих безопасность лабораторных манипуляций.

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

- организация принудительной вентиляции воздуха в помещениях и на рабочих местах (общая и локальная вентиляция), исключающей попадание инфекционного аэрозоля в коридоры и другие смежные помещения;
- удаление или инактивация инфекционного аэрозоля, находящегося в воздухе помещений, с использованием технических средств, позволяющих производить обеззараживание (фильтрация воздуха, его облучение, другая инактивация микобактерий туберкулеза, приводящая к их разрушению, и др.);
- обеззараживание поверхностей в лаборатории (облучение, другие методы эффективной инактивации микобактерий туберкулеза).

Удаление и обмен воздуха в помещениях путем естественной вентиляции допустимы лишь для неинфицированных помещений.

Общая принудительная вентиляция (приточная, вытяжная или приточно-вытяжная) должна обеспечивать удаление загрязненного (инфицированного) воздуха из помещения и препятствовать возникновению застойных зон. В случае использования приточной вентиляции в качестве единственного инженерного мероприятия по очистке воздуха она должна обеспечивать шестикратный воздухообмен в инфицированной зоне лаборатории. С этой целью места поступления и отбора воздуха должны быть размещены таким образом, чтобы чистый воздух вначале направлялся в те части комнаты, где работает персонал, а затем, обтекая источник инфекции, поступал на выброс.

Локальная вентиляция должна обеспечивать удаление инфицированного воздуха из зоны работы с инфицированным материалом. Она может быть организована в виде локальных вытяжных зонтов, колпаков, вытяжек

и других технических устройств. При работе с инфицированным материалом локальная вытяжная вентиляция должна быть оснащена бактерицидными фильтрами или другими устройствами, предотвращающими выброс инфекционного аэрозоля наружу, а также обратный ток воздуха в момент выключения вентиляции. Линейная скорость потока воздуха таких устройств обычно составляет 0,3–1 м/с.

Обеззараживание воздуха и системы рециркуляции воздуха внутри помещений

Системы обеззараживания воздуха должны обеспечивать снижение концентрации инфекционного аэрозоля в воздухе и поддержание ее на заданном нормативными документами уровне. Устройства обеззараживания воздуха могут использоваться как в системе общей вентиляции, так и в автономном режиме рециркуляции воздуха в помещении. Преимуществом использования устройств обеззараживания воздуха рециркуляционного типа является возможность уменьшения кратности воздухообмена и затрат электроэнергии по сравнению с системами общей вентиляции, а также простота эксплуатации и технического обслуживания. Конструкции внутрикомнатных систем рециркуляции могут различаться, поэтому их применение должно контролироваться специалистами.

Стационарные и портативные установки на основе высокоэффективных («HEPA») фильтров эффективны, однако являются дорогостоящими и требуют постоянного инженерного обслуживания. При использовании таких устройств необходимо контролировать состояние фильтров и осуществлять их своевременную замену и утилизацию. Кроме того, такие устройства должны гарантировать высокую эффективность фильтрации инфекционного аэрозоля и работать непрерывно для исключения возможности вторичного попадания отфильтрованного инфекционного аэрозоля в воздух помещения.

Устройства, инактивирующие микроорганизмы, должны обеспечивать разрушение микробных клеток в процессе обработки воздуха и не оказывать отрицательного влияния на воздушную среду, материалы, оборудование и человека. Кроме того, системы рециркуляции не должны создавать турбулентных и короткозамкнутых потоков воздуха и не должны нарушать схему потоков общей или локальной вентиляции.

В связи с изложенным такие установки должны иметь необходимые документы, разрешающие их использование в противотуберкулезных учреждениях, а также методическую документацию по правилам эксплуатации и рекомендации по их использованию в помещении. Указанные системы мо-

гут быть представлены ламинарными шкафами, фильтрующими или обеззараживающими устройствами и/или приборами, сочетающими указанные функции.

Ультрафиолетовые (УФ) облучатели. При установке УФ-облучателей необходимо быть уверенным, что они снабжены УФ-лампами со спектром, обеспечивающим обеззараживающий эффект в отношении микобактерий туберкулеза. Ультрафиолетовые установки изготавливаются в виде открытых бактерицидных облучателей, в виде экранированных облучателей, а также в виде закрытых облучателей с принудительным воздухообдувом. Для противотуберкулезных мероприятий допускается использование только тех УФ-облучателей, на которые имеются документы, подтверждающие их эффективность в отношении микобактерий туберкулеза. Выраженный бактерицидный эффект в отношении микобактерий зарегистрирован при облучении объектов длиной волны, составляющей 253,7 нм.

Как правило, бактерицидный эффект УФ-облучения воздуха зависит от интенсивности его обмена в помещении. Дополнительное использование вентиляторов в закрытых облучающих системах может удвоить наблюдаемый бактерицидный эффект, однако большие скорости перемешивания уменьшают время воздействия УФ-облучения на единицу объема воздуха, что снижает эффективность прибора. Дополнительное условие успешного применения экранированных УФ-облучателей – наличие большой кубатуры помещения и их длительная работа.

При облучении поверхностей, непосредственно используемых для работы с заразным материалом, необходимо помнить, что эффективность прямого облучения поверхности обратно пропорциональна квадрату расстояния до нее. В связи с этим необходимо правильно пользоваться расчетами, определяющими обеззараживающий эффект энергии облучения на единицу облучаемой поверхности.

Следует также учитывать, что только излучатели с абсолютно чистой, свободной от пыли поверхностью способны эффективно обеззараживать воздух и поверхности помещения. По этой причине очистку бактерицидных облучателей следует производить марлевым тампоном, смоченным 96% этиловым спиртом.

Влажность помещений является критическим параметром при использовании УФ-облучателей, а также обеззараживающих и фильтрующих приборов, действующих на основе электростатических взаимодействий (HEPA-фильтры) или иных электромагнитных принципов. УФ-облучение наиболее эффективно при общей влажности воздуха 60–65%. Увеличение влажности

воздуха до 95% делает дезинфекцию посредством облучения труднодоступной задачей. Это справедливо также в отношении электростатических фильтров и приборов на основе электромагнитных взаимодействий. В связи с этим влажную гигиеническую уборку помещений не следует совмещать с различного рода облучающей или иной электромагнитной обработкой воздуха помещений.

Персональная защита органов дыхания. Эти меры являются обязательными для защиты обслуживающего персонала. Однако без соответствующих административных и инженерных мер респираторы не обеспечивают надежной защиты медперсонала от инфекции.

Защитные персональные маски типа матерчатых или бумажных хирургических предотвращают распространение микроорганизмов, захватывая крупные жидкие частицы около рта или носа, но не обеспечивают защиту человека в маске от вдыхания подсохших капельных ядер. В связи с этим рекомендуется, чтобы такие маски использовали больные-бактериовыделители в случае пребывания их вне больничных палат или изоляторов.

Респираторы – это специальные виды масок, которые обладают способностью задерживать аэрозольные частицы размером свыше 1 мкм и плотно прилегают к лицу, предотвращая боковое подсасывание воздуха. Медицинскому персоналу, контактирующему с заразным материалом, рекомендуется использовать респираторы, обеспечивающие 95% задержку частиц диаметром 3 мкм и более. Например, маски 9332 (3М, США) или № 95, № 99 (США) или аналогичные. Эффективность подобных масок-респираторов снижается при увлажнении и загрязнении, поэтому их рекомендуется использовать одноразово, в крайнем случае, хранить завернутыми в чистую ткань, а не в пластиковых пакетах, удерживающих влагу. Время эффективной работы невосстанавливаемых респираторов во многом определяется степенью загрязненности и влажности воздуха и обычно составляет не более 50 часов. Данные маски-респираторы запрещается обрабатывать термически, дезинфицирующими растворами, спиртом или другими растворителями, помещать в зону работающего бактерицидного облучателя, сгибать для ношения в рабочей одежде или хранения, передавать в пользование другим лицам.

Следует отметить, что использование медицинским персоналом масок-респираторов особенно рекомендовано в следующих случаях:

- при непосредственном участии медицинского работника в процессе сбора мокроты пациентом;
- при выполнении лабораторным работником манипуляций с культурой возбудителя туберкулеза.

В условиях КДЛ ОЛС возможно использовать обычные защитные маски, которые следует надевать при выполнении процедуры приготовления мазков из мокроты, а также при приеме, осмотре и разборе поступающего в лабораторию диагностического материала.

19.2. Общие правила безопасности и гигиены при работе с туберкулезной инфекцией

Правила лабораторной гигиены при контакте с туберкулезной инфекцией отличаются большей жесткостью и строгостью в использовании дезинфицирующих средств, чем при контакте с другими микроорганизмами. Исследования показывают, что риск заболевания туберкулезом среди сотрудников лабораторий в 3–5 раз выше, чем среди работников административного звена и населения в целом, и что степень риска зависит от специфики работы лаборатории.

M. tuberculosis распространяются воздушно-капельным путем в виде мельчайших аэрозольных частиц. Количество микобактерий туберкулеза, достаточное для инфицирования, очень невелико – не более 10 жизнеспособных микробных клеток. Заразные частицы обычно распространяются в воздухе лабораторных помещений как воздушно-капельные аэрозоли, возникающие в процессе лабораторных манипуляций с зараженным материалом. Образующиеся после высыхания ядра аэрозолей могут долгое время сохраняться в воздушной среде, в том числе во взвешенном состоянии, и служить источником инфекции.

К мерам предосторожности в лабораториях, проводящих исследования с микобактериями и загрязненным ими материалом, относятся меры, направленные на:

- строгий контроль за проведением манипуляций, в процессе выполнения которых происходит образование и распространение воздушно-капельных и пылевых аэрозолей;
- профилактику вдыхания работниками аэрозольных частиц, взвешенных в воздушной среде;
- профилактику инфицирования путем случайного проникновения в организм возбудителя через кожные покровы или пищеварительную систему.

Обеспечение биологической безопасности сотрудников лабораторий, работающих с возбудителем туберкулеза, основано на мерах первичной профилактики, которые направлены на защиту работников и воздушной среды

лаборатории. Помещения лаборатории должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией. При этом основной вентиляционный поток воздуха должен быть направлен из чистых зон в зоны наибольшего загрязнения. В летнее время, при использовании естественной вентиляции, потоки свежего воздуха не должны проходить через рабочие столы, где готовятся мазки, в направлении работника, который занимается приготовлением мазков.

Больные туберкулезом составляют группу риска в отношении ВИЧ-инфекции, поэтому пробы мокроты, крови и спинномозговой жидкости, полученные от таких пациентов, могут одновременно служить источником вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

Особое внимание следует обратить на повышенную опасность заболевания туберкулезом ВИЧ-инфицированных работников лабораторий.

Организация безопасности в лаборатории при работе с туберкулезной инфекцией начинается с административных мер. В обязанности администрации входит создание необходимых условий, способствующих тому, чтобы персонал:

- прошел подготовку по использованию безопасных методов работы;
- был осведомлен о ***наиболее опасных методах работы*** и о процедурах, которые требуют особых мер предосторожности (см. ниже);
- был обеспечен необходимым оборудованием и средствами индивидуальной защиты;
- был проинструктирован о первоочередных мерах при чрезвычайной ситуации;
- был осведомлен о повышении риска заболевания туберкулезом при ВИЧ-инфицировании;
- регулярно проходил медицинский осмотр.

Персонал лаборатории отвечает:

- за неукоснительное соблюдение правил техники безопасности;
- правильное выполнение работ, обеспечивающее его личную безопасность и безопасность других сотрудников;
- использование средств индивидуальной защиты;
- своевременное оповещение ответственного по технике безопасности и руководителя лаборатории обо всех происшествиях (несчастных случаях).

Самое дорогое и совершенное оборудование не заменит простых мер безопасности и аккуратности в работе.

Неукоснительное соблюдение мер безопасности и производственной гигиены – обязанность каждого работника лаборатории.

19.3. Техника безопасности лабораторных процедур

Различные виды процедурных рисков описаны в соответствующих разделах руководства. Тем не менее на некоторые из них необходимо обратить особое внимание.

Вдыхание инфицированных частиц

Большинство случаев инфицирования обусловлено потенциально заразными аэрозолями, содержащими микобактерии туберкулеза. Подобные аэрозоли возникают при выполнении многих лабораторных манипуляций, при которых лопаются пузырьки жидкости, частицы ее просачиваются через мельчайшие отверстия или ударяются о твердую поверхность. Крупные (диаметр более 5 мкм) частицы жидкости быстро оседают и инфицируют кожные покровы, одежду, поверхности рабочего стола и приборов. Однако наибольшую опасность представляют мельчайшие аэрозольные частицы диаметром 1–5 мкм, составляющие «респирательную» фракцию аэрозоля и содержащие единичные особи микобактерий. При дыхании они способны проникать вплоть до легочных альвеол и оседать в них, формируя начало инфекционного процесса.

Наибольшая опасность возникновения и рассеивания аэрозолей возникает при следующих процедурах и манипуляциях.

Сбор пациентом проб мокроты при откашливании

Больных, у которых подозревают заболевание туберкулезом, иногда сразу направляют в лабораторию для сбора проб мокроты. Подобная практика недопустима, так как это подвергает работников лаборатории высокому риску заражения аэрозолями, образующимися во время сбора мокроты. Сбор проб следует осуществлять в специально оборудованных помещениях, оснащенных бактерицидными лампами, локальной вытяжкой и пр. В крайнем случае, сбор мокроты можно производить на открытом воздухе, где появившиеся аэрозоли растворяются в воздушной среде и обеззараживаются под воздействием прямых солнечных лучей.

Подготовка препаратов, нанесение мазков

Открытие флаконов с материалом, разбор материала и нанесение материала на предметное стекло – это наиболее опасные виды работ, которые должны производиться под вытяжным устройством или с использованием безопасного оборудования (например, химический вытяжной шкаф).

Инструменты должны быть удобными. Кроме того, необходимо следить, чтобы фиксация препаратов над горелкой производилась только после их полного высыхания.

Работа с бактериологической петлей (лопаткой)

Во время работы бактериологические петли (лопатки), содержащие остатки исследуемого материала, перед прокаливанием в открытом пламени горелки следует сначала очистить в емкости, содержащей 70° этиловый спирт и промытый песок. Это способствует очистке петли от остатков материала, предотвращая его разбрызгивание во время прокалывания.

Работа с градуированными пипетками

Никогда не производите отбор материала пипетками с помощью рта. Дело не только в том, что может произойти аспирация инфицированного материала. Во время очередного забора и выливания жидкости из пипетки происходит образование аэрозолей. Поскольку при этом лицо лаборанта находится непосредственно над открытым сосудом, происходит прямое вдыхание аэрозолей.

Удаление материала из пипетки следует производить медленно и осторожно, чтобы избежать образования пузырька из последней капли жидкости. Лопнувший пузырек воздуха также приводит к образованию аэрозолей. Пузырьки особенно часто образуются при использовании пипеток Пастера.

Работа с центрифугами

В лабораториях рекомендуется пользоваться напольными центрифугами, снабженными герметическими емкостями, препятствующими образованию аэрозолей. Желательно, чтобы центрифуга была оснащена электрическим запорным устройством, предотвращающим открывание крышки при работающем роторе.

Во время центрифугирования пробирки обязательно должны быть плотно закрыты и сбалансированы. Если во время центрифугирования в пробирке образуется течь или трещина, это может привести к выбросу материала и образованию аэрозолей.

Работа с дезинфицирующими средствами

Дезинфицирующие растворы должны быть свежеприготовленными и перед началом работы расставлены в подходящих емкостях в каждой из рабочих зон, где происходит контакт с заразным материалом.

Если необходимо залить отработанные материалы дезинфицирующим раствором, это следует производить осторожно и ни в коем случае не взбалтывать, если емкость или пробирка не закрыты плотно. После обра-

ботки (обеззараживания) отработанную жидкость следует осторожно слить через воронку (по ее краю), не допуская разбрызгивания, в специальную емкость с соответствующим дезинфицирующим раствором. При вливании в дезинфицирующие растворы загрязненных жидкостей последние могут разбрызгиваться и образовывать аэрозоли, инфицирующие прилегающие поверхности. Поэтому нижнее отверстие воронки должно располагаться непосредственно в дезинфицирующем растворе.

Инфицирование через рот

Инфекция может попасть в организм через рот путем аспирации при пипетировании материала ртом и через руки и предметы, загрязненные при контакте с рабочими поверхностями. Руки также могут быть инфицированы при соприкосновении с флаконами, содержащими диагностический материал. Поэтому при приеме материала рекомендуется пользоваться одноразовыми перчатками и обязательно дезинфицировать поверхности поступающих контейнеров (флаконов) с диагностическим материалом.

Инфицирование через кожные покровы

В лабораторной практике нередки случаи повреждения кожных покровов иглами, поэтому ни в коем случае не рекомендуется пользоваться вместо пипеток иглами для подкожных инъекций. Кроме того, следует остерегаться порезов и не пользоваться поврежденной стеклянной посудой. Наиболее опасны стеклянные пипетки Пастера. По мере возможности вместо стеклянной лабораторной посуды следует использовать пластиковые емкости и пипетки.

19.4. Гигиена лабораторных помещений

Работу с патогенными биологическими агентами III–IV группы патогенности (в том числе с диагностическим материалом, подозрительным на содержание таковых) могут проводить только лаборатории, имеющие разрешение Государственного санитарно-эпидемиологического надзора и нормирования Минздравсоцразвития РФ. Микобактерии туберкулеза отнесены к III группе учета патогенности. Лаборатории должны быть оборудованы согласно Федеральным санитарным правилам, нормам и гигиеническим нормативам (СанПиН) СП 1.2.731–99.

- Вход в лабораторию должен быть разрешен только работникам лаборатории.
- В рабочих помещениях лаборатории запрещается принимать пищу, пить, курить, применять косметические средства.

- Категорически запрещается использование пипеток и наклеивание этикеток с помощью рта.
- Рекомендуется использовать хирургические или сенсорные водопроводные краны.
- Руки следует мыть специальным бактерицидным мылом сразу после работы с потенциально инфицированной лабораторной посудой, после всех микробиологических процедур, снятия защитной одежды, а также перед тем, как покинуть помещение лаборатории. Для вытирания рук после мытья следует пользоваться одноразовыми бумажными полотенцами. Запрещается использовать «воздушные полотенца».
- Чистку, сервисное обслуживание и проверку оборудования для обеспечения безопасности этих операций следует проводить только в присутствии технического специалиста.
- Все поверхности в лаборатории и лабораторное оборудование должны рассматриваться как потенциально инфицированные и подвергаться регулярной дезинфекции с использованием соответствующих средств.
- ***Полы лаборатории не следует натирать или подметать. Во избежание образования лишней пыли в лаборатории следует регулярно производить только влажную уборку.***
- Обязательно проведение ежедневной влажной уборки помещений с применением адекватных дезинфицирующих средств.
- ***Дезинфекция воздуха и поверхностей помещений с помощью инженерных устройств (на основе электромагнитных, электростатических фильтров, ультрафиолетового излучения и т. д.) должна проводиться после просушки помещений.***

19.5. Дезинфицирующие средства

Эффективность дезинфицирующей способности различных средств зависит от численности популяции микроорганизмов, активности и используемой концентрации дезинфектанта, времени контакта его с микроорганизмами и присутствия в нем органических примесей.

Патентованные дезинфицирующие средства, используемые в лабораториях противотуберкулезных учреждений, содержат фенолы, гипохлориты, спирты, формальдегиды, йодофоры, глутаральдегиды, четвертичные аммониевые соединения, полигуанидины. В последние годы появились средства, содержащие в качестве действующего вещества (3-аминопропил) додецеламин [третичный алкиламин] + вспомогательные ингредиенты,

чаще всего – поверхностно-активные вещества (например, такое средство как мистраль). Тип дезинфицирующего вещества зависит от материала, подлежащего дезинфекции.

Ошибочно достаточно распространенное мнение о том, что дезинфицирующие средства, эффективные против различных видов микроорганизмов и вирусов, столь же эффективны и против микобактерий туберкулеза. Целый ряд предлагаемых на современном рынке дезинфицирующих средств обладают незначительной или не обладают вовсе активностью в отношении микобактерий туберкулеза.

Фенол применяется в виде водных растворов в концентрациях от 2 до 5%, а время контакта с заразным материалом составляет от 15 до 30 минут в зависимости от типа и количества дезинфицируемого материала. Необходимо пропитывать фенолом бумажные полотенца, которыми накрываются рабочие столы в лаборатории во время работы. Они помогают снизить разбрызгивание и образование аэрозолей в случае попадания инфицированного материала на поверхность стола. Следует учитывать, что фенол является токсичным химическим веществом и работать с ним желательно в вытяжном шкафу.

Растворы гипохлоритов обычно применяются в концентрациях от 0,5 до 5%, а время контакта с заразным материалом составляет от 30 до 120 минут в зависимости от типа и объема дезинфицируемого материала. 5% растворы гипохлоритов рекомендуется использовать для дезинфекции материалов, содержащих органические примеси (например, раствор гипохлорита натрия).

При использовании дезинфицирующих средств на основе **глутарового альдегида** применяются специальные активирующие добавки, которые поставляются производителем вместе с раствором. Как правило, глутаровый альдегид поставляется производителем в виде 2% раствора с активатором на основе бикарбонатного соединения. Глутаровый альдегид применяется для дезинфекции рабочих поверхностей и стеклянной лабораторной посуды. Активированный глутаровый альдегид подлежит использованию в течение 10–14 дней и уничтожается при помутнении.

Спирты, как правило, 70% этанол или пропанол, используются с песком для механической очистки бактериологических петель и лопаток. Спирты также следует применять вместо воды при уравнивании пробирок, подлежащих центрифугированию. В случае инфицирования рук их следует протереть 70% изопропиловым спиртом, а затем тщательно вымыть водой с мылом.

Препараты йодофора применяются в концентрациях от 3 до 5 %, а время контакта составляет от 15 до 30 минут, в зависимости от вида и объема дезинфицируемого материала. Эти препараты используются для вытирания поверхностей при разбрызгивании инфицированных жидкостей, а также для мытья рук.

В настоящее время на рынке дезинфектантов широко представлены отечественные и зарубежные средства, имеющие в качестве действующего вещества **четвертичные аммониевые соединения (ЧАС)**. Обычно в состав антисептического средства входит комплекс из двух, четырех и даже шести ЧАС, что снижает способность микроорганизмов привыкать к рецептуре и уменьшает распространение микроорганизмов, резистентных к тому или иному ЧАС. По степени воздействия на организм они относятся к 4-му классу малоопасных веществ. И хотя эти препараты активны в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, не все они оказывают туберкулоцидное действие. Перед применением каких-либо дезинфицирующих средств, содержащих ЧАС, необходимо тщательно изучить инструкцию.

Дезинфицирующие средства, прошедшие тест-контроль в НИИ дезинфектологии и ЦНИИ туберкулеза РАМН (в частности, дезэфект и дезэфект-санит) обладают бактерицидным действием в отношении лабораторных и клинических штаммов микобактерий туберкулеза при указанных режимах дезинфекции.

Антисептические препараты на основе **полигексаметилгуанидина (ПГМГ)** представляют собой водорастворимые полимеры, обладающие широким спектром биоцидного действия. Соли ПГМГ эффективны против многих патогенных микроорганизмов, в том числе и возбудителя туберкулеза. Наиболее известные препараты: ПГМГ-фосфат (фогуцид) и ПГМГ-хлорид (полисепт, инкрасепт). Бактерицидный эффект при применении инкрасепта наблюдается при режиме дезинфекции 4% – 300 мин. Но чаще всего водорастворимые полигуанидиновые препараты используются для мытья и протирания загрязненных поверхностей, так как после высыхания они образуют полимерную пленку, обеспечивающую длительную защиту поверхности от попадающих на нее микроорганизмов.

Все перечисленные дезинфицирующие средства в концентрированном состоянии достаточно токсичны и влияют на функцию дыхания, поражают кожные покровы и слизистую оболочку глаз. Однако при правильном использовании в соответствии с рекомендациями производителей они безопасны и эффективны.

Растворы не следует хранить в разбавленном виде долгое время, так как это снижает их активность. Желательно ежедневно готовить необхо-

димое количество свежих дезинфицирующих веществ. При приготовлении рабочих растворов необходимо строго соблюдать режимы дезинфекции, а именно процентное содержание средства и время обеззараживания, указанные в инструкции по применению в противотуберкулезных учреждениях. Не следует также пользоваться сильноароматизированными «антисептиками» во избежание аллергических реакций (головная боль, тошнота, и т.п.).

Все дезинфектанты должны использоваться, согласно инструкциям фирм-производителей и в соответствии с регламентирующими разрешительными документами.

Некоторые дезинфицирующие средства, рекомендованные к применению в противотуберкулезных учреждениях РФ для противотуберкулезной обработки, представлены в **таблице 3**.

Таблица 3

**Дезинфицирующие средства, применяемые
в противотуберкулезных учреждениях**

№ п/п	Наименование дезинфицирующего средства	Концентрация (в %)	Время обработки (в мин)
1	Хлорамин ¹⁾	5	360
2	Перекись водорода ¹⁾	3	180
3	Хлорная известь	10–20	60
4	Карболовая кислота (фенол)	2–5	15–30
5	Гипохлорит	1–5	15–30
6	Активированный глутаровый альдегид	2	15–60
7	Этиловый спирт	70	15–60
8	Йодофор	3–5	15–30
9	Метод кипячения ¹⁾	–	60
10	Метод кипячения с гидрокарбонатом натрия ¹⁾	2	45

Примечание: ¹⁾ Письмо Института профилактической токсикологии и дезинфекции № 10-05/4-1212 от 12.12.89 и Приказы № 408 от 12.07.89 и № 538 от 17.12.90.

Приготовление дезинфицирующих растворов:

- а) 5% раствор хлорамина: 50 г препарата растворить в 1 л воды до полного исчезновения мутности;
- б) 2% раствор активированного хлорамина:
 - 20 г хлорамина растворить в 1 л воды и добавить 20 г сернистого или хлористого аммония;

- 20 г хлорамина растворить в 1 л воды и добавить равный объем нашатырного спирта (NH_4OH);
- в) 2% содовый раствор – 20 г гидрокарбоната натрия растворяют в 1 л воды;
- г) 2% мыльно-содовый раствор – 20 г гидрокарбоната натрия и 20 г хозяйственного мыла растворяют в 1 л воды. Измельченное мыло растворяют в 1 л воды, после чего добавляют 20 г бикарбоната натрия и перемешивают до растворения.

19.6. Оборудование и принадлежности для обеспечения безопасности лабораторных процедур

Согласно существующим нормам (в частности, Приказ МЗ № 380), клинико-диагностические лаборатории ОЛС должны быть оборудованы химическими вытяжными шкафами, подключенными к вытяжной локальной вентиляции. Желательно иметь в лаборатории отдельный вытяжной шкаф, предназначенный исключительно для проведения процедур приготовления, фиксации и окраски мазков из нативной мокроты методом Циля–Нильсена.

В том случае, если лаборатория оснащена специальным защитным шкафом с ламинарным потоком воздуха (ЛШ), то подготовку материала и приготовление мазков для микроскопического исследования на кислотоустойчивые микобактерии следует проводить в ламинарном шкафу.

Защитный бокс с ламинарным потоком воздуха («ламинарный шкаф»).

Для прямой и возвратной вентиляции в ЛШ используются специальные высокоэффективные фильтры («HEPA»), способные улавливать частицы размером 3 мкм и менее (т. е. размеры практически всех бактерий, спор и вирусов). Фильтры обеспечивают эффективность очистки на уровне 99,97 %.

В лабораториях, работающих с туберкулезной инфекцией, можно использовать два типа ЛШ. Один из них – ЛШ класса I, работающий под отрицательным давлением с минимальной фронтальной тягой 20–25 метров в минуту и с выбросом 100% воздуха за пределы лаборатории. Этот тип ЛШ обеспечивает эффективную защиту оператора (работника лаборатории), но не защищает исследуемый материал от загрязнения посторонней микрофлорой. Поэтому ЛШ класса I может применяться в лабораторной технологии для проведения ограниченного числа манипуляций.

ЛШ класса II обеспечивает двойную защиту – оператора и диагностического материала или культур микроорганизмов, с которыми он работает. Это достигается тем, что в данном ЛШ действуют два воздушных потока: фронт-

тальный, втягивающий воздух от оператора, защищая его, и внутренний вертикальный ниспадающий, обеспечивающий движение воздушного потока через фильтры «HEPA» над рабочей зоной. Отработанный воздух после прохождения его через фильтры очищается и вновь поступает в лабораторию (шкафы типа А) или удаляется за пределы лаборатории (шкафы типа В).

Сила тяги ЛШ устанавливается производителем при изготовлении продукта и составляет: в ЛШ класса I – 30 см/с, в ЛШ класса II – 40–50 см/с. Технические характеристики ЛШ подлежат ежегодной проверке и сертификации квалифицированным специалистом. Необходимо проводить регулярные проверки тяги с помощью анеометра (ежеквартально или чаще, в зависимости от степени запыления).

Ламинарные шкафы подобного типа хорошо зарекомендовали себя в бактериологических и вирусологических лабораториях.

При работе с ЛШ необходимо соблюдать следующие меры предосторожности:

- входное окно ламинарного шкафа не должно заставляться подручными материалами и средствами;
- следует пользоваться методическими приемами, позволяющими избежать разбрызгивания жидкостей и образования аэрозолей, что позволяет снизить риск инфицирования персонала микроорганизмами, содержащимися в материале, который обрабатывается в ЛШ; согласно общепринятым правилам, для снижения риска перекрестного загрязнения достаточно держать чистые материалы на расстоянии не менее 12 см от основного места выполнения манипуляций, могущих привести к образованию аэрозолей;
- пробирки и другие емкости не следует держать открытыми в вертикальном положении; их следует сразу же закрывать; это позволит снизить риск перекрестного загрязнения;
- в работающем ЛШ использование горелок с открытым пламенем затруднено и нежелательно во избежание возникновения турбулентных воздушных потоков, нарушающих нормальную циркуляцию воздушных масс; для обеззараживания бактериологических петель вместо открытого пламени необходимо пользоваться специальными малыми электрическими сжигателями (печками для обжига петель);
- для обеззараживания материалов перед удалением из ЛШ следует осторожно (не допуская разбрызгивания!) погрузить их в кювету с соответствующим дезинфицирующим раствором и выдержать в нем перед удалением из ЛШ в течение необходимого времени; можно

также воспользоваться специальными закрытыми емкостями или контейнерами, применяемыми для складирования заразного материала перед автоклавированием.

Дезинфекцию ЛШ следует проводить не реже одного раза в год при замене фильтров. Уничтожение микобактерий на фильтрах проводится с помощью паров формальдегида. Деконтаминация обязательна перед сменой фильтров и при любых внутренних ремонтных работах.

Защитная одежда

При работе в лаборатории необходимо пользоваться спецодеждой.

- При входе в рабочую зону лаборатории все лица должны полностью заменить свою верхнюю одежду и обувь, в которых они ходят по улицам или в других помещениях, на специальную рабочую (халат или специальный костюм, защитная маска и головной убор).
- **Халаты** должны быть с длинными рукавами и полностью закрывать тело, грудь и шею.
- **При работе в ЛШ классов I и II** оператору желательно надеть специальный халат, защитный пластиковый фартук, головной убор, респиратор, бахилы. По окончании работы в ЛШ и переходе в административную зону или в более чистое помещение эту защитную одежду следует снять и поместить в закрытый контейнер или специальный мешок для автоклавирования или дезинфекции и последующей стирки.
- Сотрудники, которые пользуются контактными линзами, при работе в ЛШ классов I и II должны надевать защитные очки.
- **Перчатки** следует использовать при работе с потенциально загрязненными материалами, а также с потенциально загрязненными предметами и поверхностями. Перчатки также предохраняют от проникновения инфекции через поврежденные кожные покровы. Манжеты защитных перчаток должны быть достаточно длинными, чтобы их можно было натянуть на рукава халата. При повреждении или видимом загрязнении перчаток их следует немедленно удалить и перед использованием другой пары тщательно вымыть руки с мылом.

Одноразовые перчатки не следует мыть или использовать повторно!

- Изготовленные промышленным способом **защитные маски** (респираторы № 95 и № 99, сертифицированные Национальным институтом профбезопасности и здравоохранения (США); № 9332, 3М, США), способные задерживать более 95% частиц диаметром от

3 мкм, используются при выполнении всех манипуляций с загрязненным материалом и культурами. Маски-респираторы не должны использоваться дольше срока, указанного в инструкции по их применению. Маски-респираторы **не подлежат** обеззараживанию теплом, ультрафиолетом или иным ионизирующим или радикал-образующим излучением. При хранении они должны быть сухими и не иметь складок от перегибов. В случае использования невозстанавливаемых масок-респираторов рекомендуется их одноразовое использование. Более удобным является использование специальных респираторов со сменным фильтром.

Перед выходом из лаборатории защитную одежду необходимо снять, поместить в закрытый контейнер или специальный мешок для последующего обеззараживания и стирки.

19.7. Устранение последствий утечки загрязненного материала

Для обеспечения безопасности работы в лаборатории необходимо:

- сознавать, что внештатная ситуация не исключена и может возникнуть в любой момент;
- составить план действий по максимально быстрой нейтрализации потенциально вредных последствий нештатной ситуации;
- обсудить меры по снижению вероятности возникновения и профилактике внештатных ситуаций.

Наилучшая защита от утечки заразных материалов – тщательно продуманный план быстрой и эффективной нейтрализации последствий. **Ни одно происшествие в лаборатории не может рассматриваться как малозначительное.** И в то же время необходимо проводить тщательную оценку серьезности каждой внештатной ситуации, чтобы определить наиболее целесообразные шаги по предотвращению и устранению последствий.

В порядке подготовки мер к ликвидации возможной утечки заразных материалов в помещениях, где такие ситуации наиболее вероятны, или в непосредственной близости от них, следует приготовить:

- бумажные полотенца или ткань;
- емкость с дезинфицирующим средством, имеющую широкое отверстие, чтобы обеспечить быстрое использование дезинфицирующего раствора;

- маски промышленного изготовления, способные фильтровать частицы размером 1–5 мкм.

Все случаи утечки заразного материала, которые могут произойти в лаборатории, можно разделить на две категории:

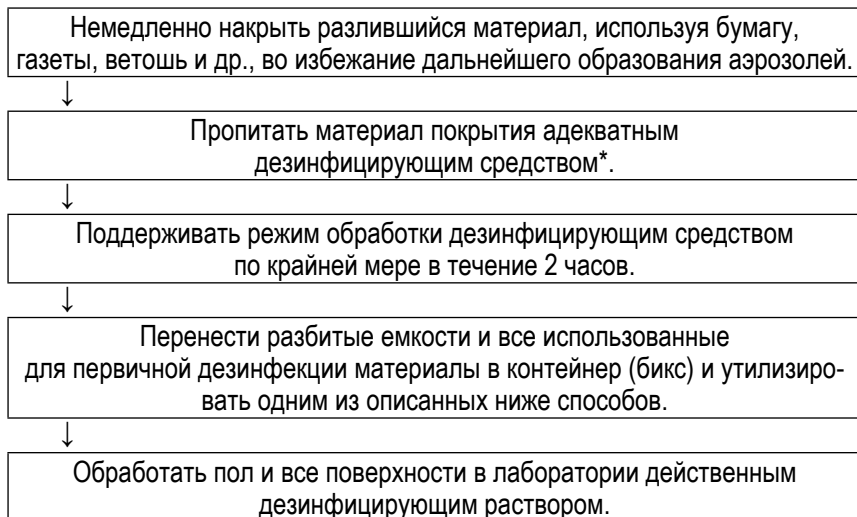
- образование небольшого количества аэрозолей;
- образование больших количеств потенциально загрязненных аэрозолей.

Небольшое количество аэрозолей может образоваться в результате того, что разобьется любая емкость (пробирка, флакон) с мокротой или другим потенциально инфицированным материалом или же разольется ее содержимое. В тех случаях, когда содержимым емкости является достаточно густая мокрота, образование аэрозолей, содержащих микобактерии туберкулеза, в значительной мере ограничено. Однако жидкие материалы являются источником большого количества аэрозолей и требуют немедленного проведения соответствующих мероприятий.

План действий в случае образования небольших количеств аэрозолей представлен на **схеме 1**.

Схема 1

План действий в случае образования в лаборатории небольших количеств аэрозолей



*Примечание: * – 5% раствор из смеси глюконата хлоргексидина (15 мг/мл) и цетримида (150 мг/мл), или 5% раствор гипохлорита, или другие разрешенные против туберкулезной инфекции дезинфицирующие средства.*

Большие количества потенциально загрязненных аэрозолей могут образоваться в результате того, что разобьется несколько емкостей или одна и пробирка и более при центрифугировании неуравновешенных пробирок.

План действий в случае образования больших количеств потенциально загрязненных аэрозолей представлен на **схеме 2**.

Схема 2

**План действий в случае образования в лаборатории
больших количеств аэрозолей**



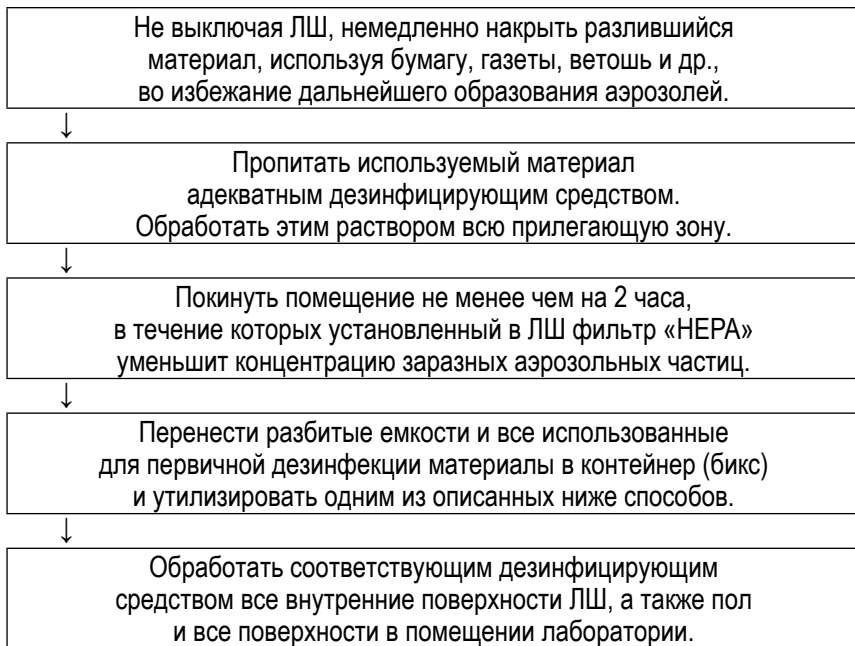
Утечка заразного материала в ЛШ

В случае утечки заразного материала внутри ЛШ **шкаф не следует отключать**.

План действий в случае образования в ЛШ незначительного объема аэрозолей представлен на **схеме 3**.

Схема 3

План действий в случае образования ограниченного количества аэрозолей в ЛШ



Представленные выше схемы последовательности необходимых действий при ликвидации последствий возможных нештатных ситуаций должны быть размещены непосредственно у мест работы сотрудников лаборатории.

20. УТИЛИЗАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕННЫХ МАТЕРИАЛОВ

Все загрязненные материалы не должны выходить за пределы лаборатории за исключением тех случаев, когда они, соответствующим образом

подготовленные и упакованные, направляются в другую лабораторию. Перед уничтожением или повторным использованием все загрязненные материалы, предметные стекла, пробирки с культурами и флаконы необходимо дезинфицировать и стерилизовать.

Стерилизация означает полное уничтожение всех микроорганизмов, в то время как под **дезинфекцией** понимается уничтожение патогенных микроорганизмов. Стерилизация обычно проводится с использованием высоких температурных режимов, а дезинфекция – с использованием растворов химических веществ.

В ЛШ и на каждом рабочем месте, где существует вероятность контакта с туберкулезной инфекцией, должна постоянно находиться емкость с дезинфицирующим средством (обычно 5% раствор хлорамина В), в которую помещаются загрязненные пипетки, петли и другие предметы, используемые в лабораторных исследованиях. Емкость должна быть достаточно глубокой, чтобы вся рабочая поверхность помещенных в нее предметов полностью покрывалась дезинфицирующим раствором.

В непосредственной близости от ЛШ должна находиться емкость из нержавеющей стали с крышкой, куда помещаются использованные загрязненные флаконы и пробирки, емкости для отбора проб, а также другой зараженный материал.

Потенциально инфицированные жидкости нельзя сливать в канализацию! Для этого следует использовать специальные емкости, которые можно обрабатывать в автоклавах.

Стеклянную лабораторную посуду по возможности необходимо заменить на пластиковую одноразовую. Разбитую посуду следует собрать с помощью совка и веника или специальных щипцов, а осколки перед выбросом продезинфицировать.

Флаконы и контейнеры для сбора мокроты

Использованные пластиковые контейнеры необходимо сжигать или подвергать автоклавированию при 126 °С (1,5 атмосферы) в течение 60 минут. Перед автоклавированием их следует завернуть в бумагу, так как в процессе автоклавирования при указанном режиме пластик расплавляется и может пристать к находящейся в этой же порции материала стеклянной посуде, что приведет ее к непригодности.

Согласно рекомендациям ВОЗ и Международного союза по борьбе с туберкулезом, для обеззараживания одноразовых пластиковых контейнеров для сбора мокроты можно использовать более мягкий режим автоклавиро-

вания – при 121 °С (1 атмосфера) в течение 20 минут, что позволяет избежать слипания и склеивания пластика в процессе автоклавирования.

Стеклянные емкости можно использовать повторно. Для этого их сначала автоклавируют, затем кипятят в течение 45–60 минут, тщательно отмывают и стерилизуют в сухожаровом шкафу в упакованном виде.

Аппликаторы, пипетки, проволочные петли

Деревянные аппликаторы и бумажные предметы обеззараживаются автоклавированием при 126 °С (1,5 атмосферы) в течение 60 минут.

Загрязненные пипетки и проволочные петли необходимо выдержать в дезинфицирующем растворе в течение времени, предусмотренного для дезинфекции, после чего их можно проавтоклавить или прокипятить. Для повторного использования указанные емкости, петли, пипетки и пр. следует промыть, высушить, упаковать и подвергнуть стерилизации в сухожаровом шкафу.

Предметные стекла

Предметные стекла с положительными результатами лабораторных исследований уничтожаются после положенного срока хранения, чтобы не допустить их повторного использования. Предметные стекла с отрицательными результатами можно использовать повторно (но только для проведения других клинико-диагностических исследований) после их дезинфекции, стерилизации и тщательного отмывания щетками с мылом, если на них нет царапин, сколов и других повреждений.

20.1. Автоклавирование

Обработка в автоклаве – необходимая процедура стерилизации. Персонал лаборатории должен быть подробно проинструктирован о порядке использования автоклава и иметь допуск к работе с ним. Автоклав помещается в зоне лаборатории. Автоклавы периодически подвергаются техническим испытаниям, чтобы убедиться в том, что создаваемая в них температура достаточна для уничтожения всех микроорганизмов. Технические испытания можно проводить с использованием специальных индикаторных трубок, которые изменяют цвет при нормальном стерилизационном процессе.

Обработка отработанного (заразного) материала в автоклаве производится при температуре не ниже 126 ± 2 °С (1,5 кгс/см²) в течение не менее 60 минут.

Если лаборатория расположена в местности, находящейся намного выше уровня моря, необходимо ориентироваться на параметры температуры, а не давления. Для этого режим работы автоклава специально подстраивают. Одноразовые автоклавные мешки обычно снабжены специальными индикаторными полосками, которые изменяют цвет по окончании процесса стерилизации. После автоклавирования использованные одноразовые материалы можно сжечь или утилизировать иным образом. Предметы многократного использования после автоклавирования моются и повторно стерилизуются.

20.2. Кипячение и сжигание

Периферические лаборатории иногда не располагают автоклавами, поэтому они должны использовать другие способы обработки и уничтожения емкостей для сбора проб, других лабораторных предметов и загрязненных материалов. Простейший способ обработки загрязненных материалов и посуды — сжигание или кипячение в течение длительного времени (не менее 60 минут в воде или 45 минут в 2% мыльно-содовом растворе).

СПИСОК ОБОРУДОВАНИЯ И РЕАКТИВОВ ДЛЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Основное оборудование:

- микроскоп бинокулярный световой со стандартным иммерсионным объективом (90х или 100х) и набором окуляров (7х, 10х);
- рабочий стол для работы на микроскопе;
- спиртовка со стеклянным колпачком или горелка Бунзена;
- баллон с бутаном;
- облучатель бактерицидный потолочный, настенный или переносной;
- вытяжной шкаф лабораторный;
- дистиллятор;
- весы для взвешивания химических реактивов, электронные с точностью до 0,01 г;
- стерилизатор паровой вертикальный для обеззараживания патологического материала и изделий медицинского назначения с объемом камеры 30–75 л;
- шкаф сухожаровой, 20–80 л.

2. Дополнительное оборудование и расходные материалы:

- капельница для нанесения масла на препарат;
- набор петель бактериологических нихромовых с петледержателем;
- подставка («рельсы») для фиксации и окраски мазков;
- лотки (поддоны) для приготовления мазков;
- лотки (подносы) для сушки мазков;
- штативы для сушки мазков в вертикальном или наклонном положении;
- емкость с отмытым речным песком и 70% спиртом;
- коробки для хранения стекол, картонные или металлические, на 12–25 стекол;
- таймер на 0 – 60 минут или песочные часы на 1, 3, 5 минут;
- пинцеты анатомические или щипцы для взятия предметных стекол;
- ножницы из нержавеющей стали;

- градуированные цилиндры на 200, 500, 1000 мл;
- фарфоровые ступки с пестиками;
- колбы разной вместимости;
- пипетки мерные на 1, 2, 5, 10 мл;
- темные флаконы, стеклянные или пластиковые, для хранения красителей;
- бутылки с капельными дозирующими трубками для нанесения красителей на препарат;
- одноразовые пластиковые контейнеры либо стеклянные флаконы для сбора проб диагностического материала;
- контейнеры (транспортные ящики) для транспортировки проб;
- планшеты для транспортировки мазков;
- предметные стекла оптические, 25 × 75 мм, толщиной 1,1–1,3 мм; ГОСТ 9284–75;
- масло иммерсионное синтетическое, ГОСТ 13739–78, с показателем преломления =1,515;
- штативы для предметных стекол, на 12–25 стекол;
- контейнер для отработанных заразных материалов (биксы);
- контейнер пластмассовый для бумажного мусора;
- вата белая гигроскопическая;
- одноразовые перчатки;
- лабораторные халаты и шапочки;
- маски;
- бумажные полотенца, одноразовые;
- ручки шариковые с красными чернилами;
- ручки шариковые с черными или синими чернилами;
- восковой карандаш или несмываемый маркер;
- фильтровальная бумага № 1;
- мягкая фланелевая ткань или специальные салфетки для протирания линз микроскопа;
- лабораторные журналы (регистрационный лабораторный журнал, журнал приготовления растворов и красителей, журналы работы оборудования и др.);
- учетно-отчетные формы;
- тетради для записей.

3. Реактивы

3.1. Растворители, кислоты:

- спирт этиловый марки ОП-2, ТУ 6-09-45-12-77, 96%;
- кислота соляная концентрированная (HCl), ГОСТ 3118-77;
- кислота серная концентрированная (H₂SO₄), ГОСТ 4204-77;
- ксилол, ГОСТ 25828-83;
- вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72.

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 – ч. д. а., ГОСТ 6259-75.

3.3. Дезинфицирующие средства:

Растворы дезинфицирующих средств:

- 5% раствор хлорамина, или
- 5% раствор фенола, или
- 5% раствор гипохлорита.

3.4. Средства индивидуальной защиты:

- резиновый фартук;
- халат из плотной ткани;
- шапочка;
- одноразовые перчатки;
- защитная маска или респиратор (№ 95, или № 99 (США), или № 9332 (3М, США).

СОСТАВНЫЕ ЧАСТИ И ПРАВИЛА ПОЛЬЗОВАНИЯ СВЕТОВЫМ МИКРОСКОПОМ

1. Рекомендации по настройке и эксплуатации микроскопа

Новое поколение отечественных и зарубежных микроскопов оснащено самоцентрирующимися галогенными лампами, фокусировка изображения нити которых в апертурной диафрагме конденсора производится на заводе-изготовителе. Это существенно облегчает настройку освещения микроскопа по Келеру, 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. Следует осмотреть, нет ли в микроскопе поврежденных или сломанных деталей.

Ниже приводятся правила настройки бинокулярного светового микроскопа отечественного производства ЛОМО «МИКМЕД 2. Вариант 2». Устройство и обозначения микроскопа приведены ниже.

Настройка освещения микроскопа

- Включить освещение микроскопа, отрегулировав его на малое напряжение, которое используется при работе с малым увеличением. Для этого используют ручку реостата, совмещенного с выключателем.
- Проверить правильность регулировки и фокусировку (направленность) источника света.
- Убедиться, что все линзы конденсора (в том числе самая верхняя сдвигная) находятся в ходе лучей подсветки.
- Убедиться, что конденсор с открытой диафрагмой занимает верхнее положение, а матовое стекло отсутствует в тракте подсветки (под конденсором).
- Установить препарат таким образом, чтобы в поле зрения микроскопа попал наиболее прозрачный участок.
- Установить в ход лучей объектив 40× и сфокусировать его на резкое изображение поверхности препарата.

- 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 центровочных винтов добиться перемещения изображения краев прикрытой диафрагмы в центр поля зрения.
- Вращая кольцо полевой диафрагмы, раскрыть ее чуть больше 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 окуляр 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.
- Отрегулировать четкость изображения в правом окуляре.
- Отрегулировать фокусировку левого окуляра с помощью специального кольца на тубусе левого окуляра.
- 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. Для сохранения микроскопа в рабочем состоянии необходимо соблюдать следующие правила.

Никогда не протирайте окуляры микроскопа спиртовыми или иными тампонами. Пользуйтесь только специальной антистатической тканью, мягкой кистью или небольшой лабораторной грушей.

После использования в течение рабочего дня необходимо:

- проверить фиксацию объективов в револьверном устройстве;
- удалить масло с объектива, конденсора и предметного столика с помощью специальных салфеток или мягкой фланелевой ткани, слегка смоченной в специальной жидкости, рекомендуемой фирмой – изготовителем микроскопа. Обычно для этих целей рекомендуется использовать ксилол (ксилен), но могут быть использованы и другие жидкости, если это оговорено в инструкции по эксплуатации микроскопа;
- 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, в нерабочем состоянии микроскоп всегда должен быть накрыт чехлом и храниться в сухом помещении.

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

- вывинтить объектив из револьверного устройства или установить его в положение, удобное для чистки;
- специально приготовленным сухим ватным тампоном одним движением руки снять иммерсионное масло с передней линзы объектива;
- смочить следующий сухой тампон в соответствующей жидкости 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 сухой мягкой тканью.

Операции очистки следует проводить очень аккуратно и осторожно; необходимо следить за количеством увлажняющей 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 окуляры специальной антистатической тканью, мягкой кистью или небольшой лабораторной грушей;
- очистить объектив и конденсор с помощью специальной салфетки для линз или мягкой фланелевой ткани, слегка смоченной в кислоте или другой специальной жидкости для чистки линз, рекомендуемой фирмой – изготовителем микроскопа;
- снять с предметного столика препаратоловодитель 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.

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 сухожаровом шкафу. После восстановления первоначального цвета силикагель можно использовать повторно.

Для удаления налета плесневых грибов используется специально приготовленный 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 протирают только **специальной мягкой тканью для линз или марлевой салфеткой**.

Окуляры наиболее чувствительны к неправильному обращению. Их следует чистить 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 разбирать микроскоп; в случае появления какой-либо неисправности ремонт должен производиться только специалистом.

2. Устройство и составные части светового микроскопа

Общий вид светового бинокулярного микроскопа изображен на рис. 18.

Составные части микроскопа:

1. Окуляр.
2. Бинокулярная насадка.
3. Револьвер для крепления объективов.
4. Объектив.
5. Механическая платформа (препаратодержатель).

6. Предметный столик микроскопа.
7. Тубусодержатель.
8. Ирисовая апертурная диафрагма.
9. Конденсор.
10. Вспомогательные полевые линзы.
11. Световой фильтр.
12. Кронштейн конденсора (Substage adjustment).
13. Набор полевых линз.
14. Электрошнур.
15. Ножка, или башмак, микроскопа.
16. Регулирующий винт грубого движения тубуса (макровинт).
17. Винт микромеханизма (микровинт) (Fine focus adjustment).
18. Светильник с галогеновой лампой.

Микроскоп (от латинского *micro*s – малый и *scopein* – рассматривать, наблюдать) – прибор, позволяющий получить увеличенное изображение объектов и структур, недоступных невооруженному глазу человека.

В практике медико-биологических исследований применяются микроскопы различной конструкции и сложности. Для исследования препаратов с целью выявления и количественной оценки возбудителя туберкулеза необходим бинокулярный микроскоп с освещением препарата по Келеру. Суть его состоит в точном совмещении осей подсветки и изображения.

Световая микроскопия основывается на законах геометрической оптики и волновой теории образования изображения. Все оптические элементы влияют на качество изображения, поэтому составляющие звенья построения изображения (включая предметные и покровные стекла, иммерсионное масло и т. д.) должны отвечать определенным техническим требованиям (ГОСТам).

Микроскоп имеет как минимум две ступени увеличения и состоит из трех основных функциональных частей:

- осветительной;
- воспроизводящей;
- визуализирующей.

1. **Осветительная** часть предназначена для создания светового потока, который позволяет осветить объект таким образом, чтобы последующие части микроскопа предельно точно выполняли свои функции.

Осветительная часть включает источник света (лампа и электрический блок питания) и оптико-механическую систему (коллектор, конденсор, регулируемые полевая и апертурная ирисовые диафрагмы).



Рис. 18. Общий вид и устройство светового бинокулярного микроскопа

2. **Воспроизводящая** часть предназначена для воспроизведения объекта в плоскости изображения. Она обеспечивает первую ступень увеличения и расположена между объектом и плоскостью изображения микроскопа. В состав воспроизводящей части входят объектив и промежуточная оптическая система. В состав последней включается тубусная система, которая собирает выходящие из объектива параллельные пучки света в плоскости изображения микроскопа.

3. **Визуализирующая** часть предназначена для получения реального изображения объекта с дополнительным увеличением (вторая степень увеличения) на сетчатке глаза, фотопленке или экране монитора. Визуализирующая часть расположена между плоскостью изображения объектива и глазами наблюдателя (камерой, фотокамерой). В ее состав входят моно-, би- или тринокулярная визуальная насадка с наблюдательной системой (окуляры) и системы дополнительного увеличения (проекторные насадки, системы анализа и документирования изображения).

Современный микроскоп состоит из следующих конструктивно-технологических частей:

- оптической;
- механической;
- электрической.

Механическая часть микроскопа. Основным конструктивно-механическим блоком микроскопа является *штатив*, состоящий из основания и тубусодержателя. **Основание** представляет собой блок, на котором крепятся все составные части микроскопа. В современных микроскопах в основа-

ние встраивается осветительная система с блоком питания или без него (выносной блок питания). Встроенный источник света неподвижен и находится на постоянном месте. Обычно используются небольшие галогеновые лампы, дающие интенсивный световой поток. Могут применяться и простые лампы накаливания с вольфрамовой нитью.

На кронштейне (или стойке) для крепления **тубусодержателя**, представляющем собой центральную структурную часть микроскопа, закрепляются следующие составные части:

- устройство для крепления объективов (револьверное, резьбовое или типа «салазок»);
- фокусируемый механизм грубой и точной настройки микроскопа на резкость (макро- и микровинты);
- узел крепления сменных предметных столиков (неподвижных, координатных, вращающихся);
- узел крепления и фокусируемого и центрируемого перемещения конденсора;
- узел крепления сменных насадок (визуальных, фотографических, телевизионных и др.).

В связи с тем, что основание микроскопа несет большую физическую и конструктивную нагрузку, оно должно быть достаточно устойчивым и массивным.

Предметный столик является чисто механическим узлом микроскопа. Он предназначен для крепления и перемещения в определенном положении и направлении объекта наблюдения, находящегося чаще всего на предметном стекле. Предметные стекла закрепляются специальными клеммами или скобами препаратодителя. Перемещение препарата в поле зрения осуществляется в двух плоскостях путем вращения специальных винтов, встроенных в предметный столик (более ранние модели микроскопов) или вынесенных за пределы столика.

Оптическая часть микроскопа. Оптические узлы и принадлежности обеспечивают основную функцию микроскопа – создание увеличенного достаточно качественного изображения объекта с высокой степенью достоверности по форме, соотношению размеров составляющих элементов и цвету.

Основными оптическими элементами микроскопа являются оптические элементы, образующие осветительную (в том числе конденсор), наблюдательную (окуляры) и воспроизводящую (в том числе объективы) системы микроскопа.

Осветительная система микроскопа состоит из системы линз, диафрагм и зеркал, которая обеспечивает равномерное освещение объекта. Осветительная система проходящего света состоит из двух частей: коллектора и конденсора.

Коллектор при встроенной осветительной системе расположен вблизи источника света в основании микроскопа и предназначен для увеличения размера светящегося тела. Для обеспечения настройки коллектор может быть подвижным и перемещаться вдоль оптической оси. Вблизи от коллектора располагается полевая диафрагма микроскопа.

Конденсор – это оптическая система, фокусирующая свет на препарате и предназначенная для увеличения интенсивности поступающего в микроскоп светового потока. Конденсор расположен между находящимся на предметном столике объектом и осветителем (источником света). При настройке освещения конденсор путем вращения винтов можно перемещать вдоль оптической оси (фокусирующее перемещение) и перпендикулярно оптической оси (центрировочное перемещение) до тех пор, пока отверстие диафрагмы не будет совмещено с объективом. Чем больше апертура диафрагмы, тем шире угол зрения. Отверстие для света должно быть меньше, чем диаметр используемого объектива.

Окуляры представляют наблюдательную систему микроскопа. Она предназначена для построения микроскопического изображения на сетчатке глаза наблюдателя. Окуляры состоят из двух групп линз, помещенных на разных концах трубы: глазной – ближайшей к глазу наблюдателя – и полевой – ближайшей к плоскости, в которой объектив строит изображение рассматриваемого объекта. Нижняя линза называется коллектором; она расширяет и делает действительное изображение более четким, завершая, таким образом, работу объективов. Верхняя линза производит увеличенное и поэтому мнимое изображение предмета.

Известны различные виды окуляров: обычные, широкоугольные, компенсационные, окуляры плоского поля, проекционные, фотоокуляры и др. Крепления для окуляров размещены в окуляродержателе в верхней части тубуса, который в бинокулярных микроскопах замещен системой линз. В окуляродержателе установлены специальные призмы. В зависимости от расстояния между зрачками исследователя окуляры можно перемещать, добываясь комфортности микроскопии путем увеличения или уменьшения расстояния между ними. Кроме того, один из окуляров может вращаться вокруг своей оси, что позволяет корректировать различия в конвергенции каждого глаза.

Современная маркировка окуляров предусматривает, кроме указания линейного увеличения окуляра, размер видимого поля изображения (линейное поле в мм): например, 10 x / 18. Маркировка наносится на фронтальную (переднюю) часть окуляра или на верхнюю образующую корпуса окуляра.

Объективы – это оптические системы, предназначенные для построения микроскопического изображения объекта исследования в плоскости изображения с соответствующим увеличением, разрешением элементов, точностью воспроизведения по форме и цвету. Объективы имеют сложную оптико-механическую конструкцию, которая включает несколько одиночных и многокомпонентных линз.

Объектив состоит из фронтальной и последующей частей. Фронтальная линза (или система линз) обращена к препарату и является основной при построении изображения. Последующая часть в сочетании с фронтальной обеспечивает требуемое увеличение, фокусное расстояние и качество изображения.

Объективы различаются по величине апертуры и по увеличению. Величина апертуры характеризует свойства линз объектива. До определенного предела при увеличении апертуры объектива увеличивается его разрешающая способность.

Свет, проходя через линзы, разделяется на волны различной длины. Из-за хроматической аберрации на периферии линзы возникают цветные полосы. Чем больше увеличение, тем интенсивнее аберрация. Различные цвета (в соответствии с разной длиной волны) фокусируются в разных точках, в результате чего формируется сферическая аберрация. Это явление компенсируется благодаря использованию комбинации из нескольких линз.

Ахроматические объективы откорректированы в отношении двух цветов хроматической аберрации (желтого и зеленого) и для одного цвета сферической аберрации.

Апохроматические объективы не имеют хроматических аберраций, так как между объективом и линзами предусмотрено достаточное расстояние, хотя в них сохраняется вся часть видимого спектра. Апохроматические объективы классифицируются по расстоянию и фракционности, измеряемым в миллиметрах. Такие объективы дают более ясное и четкое изображение, чем ахроматические линзы, и могут применяться в более мощных окулярах. Плоские апохроматические линзы корректируют сферическую аберрацию.

Иммерсионные объективы. «Сухими» называются микроскопы, фронтальные линзы которых соприкасаются только с воздушной средой (показатель преломления равен нулю). Показатель преломления стекла,

используемого для приготовления мазков, соответствует 1,51. В результате световые лучи при прохождении в воздушную среду через стекло преломляются. При этом некоторые из них не попадают в поле зрения объектива.

Иммерсия (от латинского *immersio* – погружение) – жидкость, заполняющая пространство между объектом наблюдения и специальным иммерсионным объективом. В основном применяются три типа иммерсионных жидкостей: масляная иммерсия, водная иммерсия и глицериновая иммерсия. Показатель преломления иммерсии близок к показателю преломления стекла фронтального компонента объектива. В отличие от воздушной среды иммерсионное масло имеет такой же преломляющий показатель, как и стекло, и поэтому улучшает разрешающую способность линз.

Иммерсия применяется в тех случаях, когда требуется повысить разрешающую способность микроскопа. За счет применения иммерсии достигается:

- повышение видимости благодаря увеличению разности показателя преломления среды и объекта;
- увеличение глубины просматриваемого слоя, который зависит от показателя преломления среды.

При использовании масляных иммерсионных объективов иммерсионное масло заполняет пространство между передней линзой объектива и предметным стеклом. Это используется для того, чтобы добиться большого увеличения.

Итак, с помощью объектива внутри микроскопа формируется изображение, которое исследователь видит через окуляр. Чтобы получить четкое изображение, линзы должны сфокусировать каждую точку мазка и передать их в виде изображения.

Наименование ЛПУ:
Адрес:
Подразделение:

Приложение № 1
к Приказу МЗ СР РФ
от «_» _____ 20__ № _____
Медицинская документация
учетная форма № 05-ТБ/у

Направление на проведение микроскопических исследований на туберкулез

- 1) Фамилия И.О. пациента: _____
- 2) Год рождения: 3) Пол: М Ж
- 4) Адрес фактического места жительства (полностью): _____
- 5) Дата направления: 20 г.
- 6) Материал: 1 мокрота, 2 другой _____
(вписать из перечня на обороте)
- 7) Цель исследования: диагностика контроль химиотерапии
- 8) Региональный регистрационный номер пациента:
- 9) Ф.И.О. специалиста / подпись: _____
- 10) Номера образцов материала: 1 _____ 2 _____ 3 _____
(переносятся из журнала регистрации материала, форма № 04-1-ТБ/у)
- 11) Дата сбора образцов: 1 20 г. 2 20 г.
(методика сбора материала на обороте)
- 3 20 г.
- 12) Ф. И. О. / подпись медработника, собравшего образцы: _____

13) Лабораторный номер

14) Результаты микроскопического исследования

Дата проведения исследования	Образец	Отрицательный результат	Положительный результат (степень)				Примечание
			Единичные*	1+	2+	3+	
1	2	3	4	5	6	7	8
	1		КУМ*				
	2		КУМ*				
	3		КУМ*				

* Указывается точное количество микобактерий в 100 п/з

- 15) Дата выдачи результата: 20 г.
- 16) Ф. И. О. / подпись ответственного лица: _____

Лабораторный журнал регистрации микроскопических исследований на туберкулез

1	2	3	4	5	6	7	8	9		10	11	12	13	14
								Диагностика	Контроль химиотерапии*					
Лабораторный номер	Дата проведения исследования	Фамилия И. О. пациента	Пол	Год рождения	Полный адрес фактического места жительства пациента	Лечебно-профилактическое учреждение ----- Подразделение ----- Ф.И.О. медицинского работника, направившего больного	Материал	Цель исследования	Образец	Результат исследования	Подпись ответственного лица	Примечание		
											1			
											2			
											3			
											1			
											2			
											3			
											1			
											2			
											3			
											1			
											2			
											3			
											1			
											2			
											3			
											1			
											2			
											3			

Примечание: * – вписать региональный регистрационный номер больного туберкулезом

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Микробиологическая диагностика туберкулеза и микобактериозов* // Туберкулез / Под ред. А.Г. Хоменко. – М.: Медицина, 1996. – С. 102–128.
2. *Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях*. 2-е изд. – Всемирная организация здравоохранения. – Женева, 1994. – 146 с.
3. *Медицинские лабораторные технологии: Справочник* / Ред. А.И. Карпищенко / – С.-Петербург, 1998. – Т. 2. – С. 30–59.
4. Bass J.B., Farer L.S. Hopewell Ph.C. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. – Amer. Thorac. Soc. – 1990. – 11 p.
5. Bennedsen J., Larsen S.O. Examination for tubercle bacilli by fluorescence microscopy // Scand. J. Resp. Dis. – 1966. – V. 47. – P. 114–120.
6. Collins C.H., Grange J.M., Yates M.D. Tuberculosis Bacteriology. 2nd ed. Organization and Practice. – Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997.
7. Enarson D.A., Rieder H.L., Arnadottir T. Technical Guide for Sputum Examination for Tuberculosis by Direct Microscopy. – IUATLD, 1994. – P. 49–64.
8. *International Union Against Tuberculosis*. Technical Guide for sputum examination for tuberculosis by direct microscopy // Bull. Int. Un.Tuberc. – 1978. – Suppl. 2. – P. 4–16.
9. Kent P.T., Kubica G.P. Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory. – Centers for Disease Control, 1985. – 207 p.
10. *Laboratory Services in Tuberculosis Control* // Microscopy. Part II. WHO, 1998. – 61 p.
11. Smithwick R.W. Laboratory Manual for Acid-fast Microscopy. 2nd ed. Atlanta: Centers for Disease Control, 1976.
12. *The microscope*. A practical guide. WHO Project: ICP TUB 001. WHO, Regional Office for South-East Asia. – New Delhi, India, 1999. – 40 p.
13. *The Public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory Network*. – IUATLD, 1998, 110 p.
14. IUATLD-CDC-WHO. External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy. – Japan, 2002.

ООО «Издательство «Триада». ИД № 06059 от 16.10.01 г.
170034, г. Тверь, пр. Чайковского, 9, оф. 504,
тел./факс: (4822) 42-90-22, 35-41-30
E-mail: triada@stels.tver.ru
<http://www.triada.tver.ru>

Подписано к печати... Формат бумаги 60 × 84 1/16. Бумага офсетная.
Усл. печ. листов 8,25. Тираж 2461 экз. Заказ №

Отпечатано в филиале ОАО «ТОТ» Ржевская типография.
г. Ржев, ул. Урицкого, д. 91