

Учебное пособие для проведения базового курса обучения

ВЫЯВЛЕНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗА МЕТОДОМ МИКРОСКОПИИ



Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Центральный НИИ туберкулеза РАМН

Фонд «Российское здравоохранение»

Москва 2008

Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Центральный НИИ туберкулеза РАМН

Фонд «Российское здравоохранение»

Рекомендуется
Учебно-методическим объединением по медицинскому
и фармацевтическому образованию вузов России
в качестве учебного пособия для системы
послевузовского профессионального образования врачей

УМО-107
08.02.07

Выявление ТУБЕРКУЛЕЗА методом микроскопии

Учебное пособие для проведения базового курса обучения



УДК 616-002.5-078(078)

ББК 55.4:52.64я75

В95

Настоящее учебное пособие подготовили:

- В.И. Гольшевская** доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела микробиологии ЦНИИТ РАМН
- Э.В. Севастьянова** кандидат технических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии ЦНИИТ РАМН
- М.В. Шульгина** доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела стандартизации и контроля качества клинических лабораторных исследований ГНИЦ ПМ
- Г.В. Евгущенко** кандидат медицинских наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией ЦНИИТ РАМН
- О.В. Егорова** кандидат технических наук, член Нью-Йоркской академии наук, эксперт Госстандарта по оптическим приборам

В95 Выявление туберкулеза методом микроскопии. Учебное пособие для проведения базового курса обучения «Выявление туберкулеза методом микроскопии». – М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. – 100 стр.

ББК 55.4:52.64я75

При подготовке учебного пособия использованы следующие руководства:

1. Приложения № 9, 10 к Приказу МЗ РФ № 109 от 21.03.03 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».
2. Приказ МЗ РФ № 380 от 25.12.1997 г. «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
3. Laboratory Services in Tuberculosis Control. Part 1, 2. WHO, 1998.
4. Isolation and Identification of Mycobacterium tuberculosis. A Guide for the Level II Laboratories. CDC Lab Manual. US Department of Health and Human Services/ Public Health service/Center for Disease Control.
5. Национальная туберкулезная референс-лаборатория в системе общественного здравоохранения и сеть региональных лабораторий. Минимальные потребности, роль и организация работы в стране с ограниченными возможностями. Международный союз против туберкулеза и легочных заболеваний, 1998.
6. External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy. PYL, CDC, IUATLD, KNCV, RIT Japan, WHO, 2002.
7. Manual of Technical Standards and Procedures for Tuberculosis Bacteriology. PAHO/WHO Advisory Committee on Tuberculosis Bacteriology. Note: Modified by Ronald Smithwick, Tuberculosis/Mycobacteriology Branch, DASTLR, NCID, CDC, 13 August, 2001, PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, Pan-american Sanitary Bureau, Regional Office of the WHO.
8. Fujiki A. AFB Microscopy Training. Tokyo, Japan: The Research Institute of Tuberculosis, 2005.

Настоящее учебное пособие разработано и издано по инициативе и при технической и финансовой поддержке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и при поддержке Агентства США по международному развитию (USAID).

ISBN 978-5-94789-272-7

© Оформление ООО «Издательство «Триада», 2008



| | |
|---|----------|
| Предисловие | 5 |
| Список сокращений и основные понятия | 6 |
| Введение | 7 |
| 1. Организация обследования пациентов методом микроскопии при выявлении и лечении больных туберкулезом | |
| 1.1. Структура региональной лабораторной сети | 9 |
| 1.2. Режимы и кратность обследования пациентов методом микроскопии | 10 |
| 1.3. Организация сбора, хранения и транспортировки мокроты | 11 |
| 1.3.1. Контейнеры для сбора мокроты | 11 |
| 1.3.2. Процедура сбора мокроты | 12 |
| 1.3.3. Хранение и транспортировка мокроты | 14 |
| 2. Организация работы лаборатории для проведения микроскопического исследования | |
| 2.1. Меры безопасности в центре микроскопии | 16 |
| 2.1.1. Пути распространения инфекции | 16 |
| 2.1.2. Обеспечение биологической безопасности | 18 |
| 2.1.3. Стерилизация и дезинфекция | 21 |
| 2.2. Помещение центра микроскопии | 28 |
| 2.3. Оборудование и реагенты | 30 |
| 2.3.1. Список оборудования и реактивов | 30 |
| 2.3.2. Микроскоп | 32 |
| 2.3.3. Весы | 42 |
| 2.4. Планирование работы лаборатории. Расчет потребностей центра микроскопии в расходных материалах и реактивах | 43 |
| 3. Методика прямой микроскопии мазка, окрашенного методом Циля–Нильсена | |
| 3.1. Диагностический материал | 46 |
| 3.2. Прием и регистрация поступившего материала | 46 |
| 3.3. Приготовление препаратов из мокроты | 47 |

| | |
|---|----|
| 3.3.1. Подготовка предметных стекол..... | 47 |
| 3.3.2. Способ приготовления мазков из нативной мокроты | 48 |
| 3.3.3. Фиксация мазка..... | 52 |
| 3.4. Окрашивание кислотоустойчивых микроорганизмов | 55 |
| 3.4.1. Приготовление растворов красителей | 55 |
| 3.4.2. Окраска мазков методом Циля–Нильсена | 58 |
| 3.5. Возможные ошибки при приготовлении и окраске мазка | 67 |
| 3.6. Микроскопическое исследование препаратов..... | 69 |
| 3.6.1. Методика просмотра мазка..... | 69 |
| 3.6.2. Морфологические особенности кислотоустойчивых бактерий..... | 74 |
| 3.6.3. Причины ошибок при микроскопии | 75 |
| 3.6.4. Последствия ложноположительных и ложноотрицательных результатов..... | 77 |
| 3.7. Регистрация результатов и выдача ответов..... | 77 |
| 3.7.1. Регистрация результатов исследования | 77 |
| 3.7.2. Оформление бланков ответов | 79 |
| 3.7.3. Образцы учетно-отчетных форм..... | 80 |
| 3.8. Ответы к задачам..... | 87 |
| 4. Контроль качества исследований | |
| 4.1. Внутрилабораторный контроль качества..... | 89 |
| 4.2. Внешняя оценка качества | 94 |

В рамках реализации Фондом «Российское здравоохранение» проекта «Профилактика, диагностика, лечение туберкулеза и СПИДа, компонент «туберкулез», финансируемого из средств займа МБРР, а также Программы Глобального фонда «Развитие стратегии лечения населения РФ, уязвимого к туберкулезу» был подготовлен комплект учебных материалов, предназначенных для проведения курсов обучения специалистов по лабораторной диагностике туберкулеза.

Набор учебных материалов для проведения курса обучения «Выявление туберкулеза методом микроскопии» включает в себя базовый модуль по микроскопии, рабочую тетрадь для слушателя курса, теоретическое учебное пособие и методическое руководство для преподавателей.

Учебное пособие для проведения базового курса обучения «Выявление туберкулеза методом микроскопии» (базовый модуль по микроскопии) предназначено для обучения специалистов клинической лабораторной диагностики общей лечебной сети и специализированных противотуберкулезных учреждений РФ технологии проведения микроскопического исследования для выявления кислотоустойчивых микобактерий методом Циля–Нильсена.

Учебное пособие для проведения базового курса обучения «Выявление туберкулеза методом микроскопии» (базовый модуль по микроскопии) было обсуждено на заседании Тематической рабочей группы «Лабораторная диагностика туберкулеза» при Рабочей группе высокого уровня МЗ и СР РФ (председатель ТРГ – член-корреспондент РАМН, профессор В.В. Ерохин) и рекомендовано к использованию при подготовке лабораторных специалистов.

Отдельные части данного учебного пособия, а также программа курса обучения обсуждались и были одобрены и рекомендованы к применению ведущими специалистами в области микробиологической диагностики туберкулеза во время семинара «Методы микробиологической диагностики туберкулеза. Стандартизация подходов к обучению в РФ», состоявшегося в Голицыно в 2004 г.

Разработчики учебного пособия выражают глубокую благодарность за оказанную помощь и техническую поддержку в подготовке учебного пособия специалистам ВОЗ – В. Якубовяку, Е.Д. Юрасовой, К.Ю. Малахову, Л.Н. Рыбке.

Особую признательность составители учебного пособия выражают лабораторному специалисту ВОЗ Д. Заллокко за консультативную и техническую помощь в подготовке учебного пособия, а также рецензенту ВОЗ, заведующей референс-лабораторией Литвы А. Сосновской за сделанные исправления и рекомендации.

Разработчики учебного пособия выражают глубокую благодарность за высказанные замечания и пожелания всем членам ТРГ «Лабораторная диагностика туберкулеза», а также российским и зарубежным экспертам и специалистам, принимавшим участие в рецензировании и обсуждении настоящего учебного пособия.

Коллектив разработчиков учебного пособия благодарит С.А. Попова за редактирование текста пособия.

Список сокращений и основные понятия

ТБ – туберкулез

КУМ – кислотоустойчивые микобактерии

МБ – микобактерии

МБТ – микобактерии туберкулеза

УФ – ультрафиолетовый свет (лампа)

КДЛ – клиничко-диагностическая лаборатория

ОЛС – общая лечебная сеть

ЛУ – лекарственная устойчивость

Кратность исследований – число образцов мокроты, собираемых с целью обследования пациента. С диагностической целью необходимо исследовать 3 образца мокроты от одного пациента для получения достоверного отрицательного результата. Для контроля химиотерапии исследуют 2 образца мокроты.

Эффективность микроскопии – доля пациентов с положительным мазком среди всех обследованных с целью диагностики.

Туберкулезные микобактерии – микобактерии туберкулезного комплекса, вызывающие заболевание туберкулез. К ним относятся микобактерии видов *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*.

Нетуберкулезные микобактерии – виды микобактерий, отличающиеся по этиологической роли и ряду биологических свойств от микобактерий туберкулезного комплекса.

НЕРА-фильтр – воздушный фильтр высокой эффективности. Фильтр предназначен для очистки воздуха от частиц размером менее 0,5 мкм с заданной эффективностью. В частности, фильтр применяется для очистки потоков воздуха от частиц бактериального происхождения. Например, НЕРА-фильтр используется в шкафах биологической безопасности для обеззараживания потоков воздуха и защиты от воздушно-капельной (аэрозольной) инфекции, эффективность фильтрации составляет 99,97%.

Туберкулез является инфекционным заболеванием. Основным путем распространения туберкулезной инфекции – воздушно-капельный.

Наиболее опасной с эпидемической точки зрения формой заболевания является туберкулез легких с бактериовыделением. В течение года такой больной может инфицировать от 10 до 30 человек и более.

Достоверность поставленного диагноза «туберкулез» может быть подтверждена только на основании лабораторных исследований при обнаружении МБТ в диагностическом материале микробиологическими методами.

Микроскопия мокроты – относительно быстрый, легкий и недорогой метод, который следует использовать при подозрении на туберкулез легких. Микроскопия также используется для контроля динамики лечения и подтверждения излечения.

Метод микроскопического исследования мокроты является обязательным при выявлении больных туберкулезом легких и входит во все схемы обследования пациентов с целью выявления туберкулезной инфекции. Несмотря на то, что данный метод не позволяет определить вид выявленных микобактерий, его специфичность достигает 98% в странах с высокой распространенностью туберкулеза. Диагностическая чувствительность метода микроскопии при установлении диагноза «туберкулез легких» составляет 50–70% (по данным Всемирной организации здравоохранения и Международного союза по борьбе с туберкулезом и заболеваниями легких).

Для обнаружения МБ в мазке методом микроскопии в 1 мл мокроты должно содержаться 5000–10000 МБ и более. Только часть больных выделяет достаточно большое количество МБ для диагностирования этим методом.

Однако этот метод позволяет выявить наиболее эпидемически опасную группу бациллярных больных, представляющих собой угрозу для общества.

Больные, диагностированные путем микроскопического исследования, являются наиболее контагиозными. Поэтому необходимо выявить и начать их лечение как можно раньше, чтобы прервать цепочку распространения инфекции.

Следует отметить, что в случае проведения диагностики туберкулезной инфекции у больных с массивным бактериовыделением, представляющих собой наибольшую эпидемическую опасность, чувствительность метода микроскопии превышает 90%.

Чувствительность метода микроскопии в диагностике внелегочного туберкулеза и заболеваний, вызванных нетуберкулезными микобактериями (микобактериозов), незначительна. Кроме того, даже микроскопия специфически окрашенных мазков не позволяет определить вид микобактерий.

Однако в странах с высокой заболеваемостью туберкулезом заболевания, имеющие внелегочную локализацию или вызванные нетуберкулезными микобактериями,

имеют гораздо меньшее распространение, чем легочная форма туберкулеза, а также протекают менее остро и менее заразны.

Вопросы

1. К какому типу заболевания относится туберкулез? Назовите основной путь распространения туберкулеза.
2. Какие формы ТБ и почему имеют наибольшее значение с точки зрения общественного здравоохранения и эпидемиологии?
3. Почему микроскопическое исследование мокроты считается одним из важнейших методов диагностики ТБ?

Организация обследования пациентов методом микроскопии при выявлении и лечении больных туберкулезом

1.1. Структура региональной лабораторной сети

Все лаборатории, участвующие в выявлении и контроле химиотерапии туберкулеза, объединены в единую лабораторную сеть и подразделяются на уровни, различающиеся по своим функциям.

Лабораторная сеть региона организована по территориальному принципу и включает в себя клиничко-диагностические лаборатории общей лечебной сети и лаборатории противотуберкулезных учреждений.

Лабораторная сеть региона РФ обычно имеет 3 уровня – центральная региональная лаборатория, промежуточные лаборатории среднего уровня, периферийные лаборатории.

Первый этап исследований по выявлению больных туберкулезом осуществляется так называемыми микроскопическими центрами, организованными на базе клиничко-диагностических лабораторий общей лечебной сети. Они образуют **первый уровень лабораторной сети** Федеральной Программы борьбы с туберкулезом (периферийные лаборатории). Микроскопические центры проводят микроскопическое исследование мокроты по Цилю–Нильсену при выявлении больных туберкулезом и контроле химиотерапии на амбулаторной фазе лечения.

Функциями лабораторий первого уровня являются:

- регистрация образцов, направленных для исследования в соответствии с установленными формами;
- приготовление и окраска мазков из нативной мокроты по методу Циля–Нильсена;
- микроскопия мазков и оценка результатов;
- регистрация результатов исследований и их своевременное доведение до лечебных подразделений;
- осуществление внутрилабораторного контроля качества исследований;
- поддержание оборудования в рабочем состоянии, соблюдение правил использования и хранения реактивов;
- соблюдение правил техники безопасности при работе с инфекционным материалом и опасными химическими веществами;
- сохранение мазков для проведения реанализа в соответствии с рекомендациями координатора лабораторной службы.

Второй уровень лабораторной сети (промежуточные лаборатории среднего уровня) – это бактериологические или клиничко-диагностические лаборатории, организованные на базе центральных районных и областных больниц или противотуберкулезных диспансеров, а также лаборатории противотуберкулезных больниц, осуществляющие микроскопическое исследование диагностического материала по Цилю–Нильсену.

Лаборатории этого уровня выполняют микроскопическое исследование мазков, окрашенных методом Циля–Нильсена, для выявления, подтверждения диагноза «ту-

беркулез» и контроля химиотерапии на стационарной фазе лечения, а также внешний контроль качества и помощь в обеспечении качественных исследований в лабораториях первого уровня.

Для обеспечения качества исследований и экономии реактивов лаборатории второго уровня могут взять на себя централизованное приготовление растворов красителей для микроскопии и распределение готовых растворов по микроскопическим центрам.

Лаборатории второго уровня осуществляют свою деятельность в тесном сотрудничестве с областным координатором лабораторной службы, выполняя его поручения по организации внешнего контроля качества микробиологической диагностики туберкулеза на подведомственных территориях.

Третий уровень лабораторной сети – это центральная референс-лаборатория региона, которая возглавляет лабораторную сеть данного региона. Обычно это бактериологическая лаборатория при областном, краевом или республиканском противотуберкулезном диспансере.

Вопросы

1. К какому уровню относится лаборатория, в которой вы работаете?
2. Какая лаборатория курирует вашу лабораторию?
3. Какую помощь вы можете получить от курирующей вас лаборатории?

1.2. Режимы и кратность обследования пациентов методом микроскопии

Кратность микроскопического исследования при обследовании пациента с целью диагностики туберкулеза составляет 3 образца мокроты.
При обследовании больного туберкулезом в ходе лечения (контроль химиотерапии) исследуют 2 образца.

От каждого пациента, имеющего симптомы, подозрительные в отношении туберкулезной инфекции, на микроскопическое исследование с диагностической целью направляются три пробы мокроты, собранные в течение 2–3 дней (из них не менее двух проб должны быть собраны в медучреждении под наблюдением медработника).

Существует несколько схем организации обследования пациента методом микроскопии при выявлении туберкулезной инфекции.

Например, может быть использована следующая тактика.

- **Первую** пробу мокроты пациент собирает при первом посещении лечебного учреждения. По завершении процедуры сбора мокроты пациент получает контейнер 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 медицинское учреждение.
- **Третья** проба собирается под наблюдением медицинского работника в тот же день, после того как пациент доставит в медучреждение вторую пробу материала.

В том случае если имеется риск неполучения всех трех образцов (в первую очередь – по причине недисциплинированности пациента), обычно используют другую схему, которая предусматривает контролируемый сбор диагностического материала дважды в первый день.

- **Первая проба.** Пациент приходит в больницу или поликлинику и под наблюдением медицинского работника собирает мокроту, накопившуюся в течение 1–2 часов после сна.
- **Вторая проба.** Мокрота собирается больным в тот же день через некоторое время (2–3 часа) после взятия первой пробы.
- **Третья проба.** Мокрота собирается самим больным утром следующего дня и доставляется им в медицинское учреждение.

При возможности желательно собирать утреннюю порцию мокроты в течение трех дней последовательно (обычно эта схема практикуется в условиях стационара).

Поскольку результативность бактериоскопического исследования непосредственно зависит от качества диагностического материала, необходимо строго следить за тем, чтобы в лабораторию на исследование была доставлена мокрота, а не слюна. Материал в виде слюны следует выбраковывать на этапе сбора мокроты, так как слюна не должна поступать в лабораторию и подвергаться микроскопическому исследованию.

1.3. Организация сбора, хранения и транспортировки мокроты

1.3.1. Контейнеры для сбора мокроты

Для сбора мокроты используются специальные контейнеры, которые:

- должны быть изготовлены из ударостойкого материала;
- иметь плотно завинчивающиеся или герметически закрывающиеся крышки, не допускающие просачивания жидкости;
- объем контейнеров не должен превышать 20–50 мл, что вполне достаточно для проведения исследования;
- иметь широкое отверстие для сбора мокроты (не менее 35 мм в диаметре), чтобы пациент мог легко отделять мокроту внутрь контейнера, не подвергая загрязнению его наружную поверхность;
- контейнеры должны быть изготовлены из прозрачного материала, чтобы можно было оценить количество и качество собранной пробы, не открывая крышки;
- материал, из которого изготовлены контейнеры, должен легко подвергаться маркировке и надежно сохранять ее на всем протяжении периода хранения, транспортировки и проведения исследования.

Образцы различных видов контейнеров для сбора мокроты представлены на рис. 1.



Рис. 1 Контейнеры для сбора мокроты



Рис. 2

Наилучшим вариантом является использование для сбора мокроты одноразовых пластиковых прозрачных контейнеров объемом 20–50 мл (рис. 2).

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. В этом случае эффективность прямой микроскопии (по некоторым данным) не уступает эффективности микроскопии из осадка.

При отсутствии возможности использовать одноразовые контейнеры применяются стеклянные флаконы, которые используются многократно после дезинфекции, мытья и стерилизации.

В случаях повторного использования во избежание лабораторного загрязнения диагностического материала лаборатория должна постоянно следить за качеством обработки флаконов для сбора мокроты.

1.3.2. Процедура сбора мокроты

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

Необходимо иметь в виду, что в момент откашливания больным мокроты создается очень высокий риск воздушно-капельного распространения инфекции. В связи с этим желательно, чтобы сбор мокроты производился в специально выделенном для этих целей отдельном помещении (пункте сбора мокроты), оснащенном бактерицидными лампами, средствами дезинфекции и вытяжной вентиляцией. В крайнем случае сбор мокроты может быть произведен на открытом воздухе (рис. 3).

В качестве комнат для сбора мокроты могут быть использованы приспособленные помещения с вмонтированной форточной вентиляцией или воздушным зонтом, обеспечивающими удаление инфицированного воздуха. Помещения должны хорошо проветриваться, стены должны хорошо поддаваться дезинфекции, должен иметься бактерицидный облучатель, дезинфицирующие средства. В комнате должны быть вывешены четкие и понятные инструкции, как правильно собирать мокроту. 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 с интенсивной вытяжной вентиляцией (рис. 4) либо отделение части помещения полустеклянной перегородкой для изоляции места сбора мокроты и защиты медицинского работника (рис. 5).

Сбор мокроты должен производиться в присутствии и при непосредственном участии медицинского работника.

Лицам, ответственным за сбор мокроты, необходимо руководствоваться следующими правилами.

1. Объяснить больному 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 (2–3) глубоких вдохов.



Сбор мокроты на открытом воздухе **Рис. 3**



Кабина для сбора мокроты **Рис. 4**



Рис. 5 Комната для сбора мокроты

Необходимо также предупредить больного, 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.

2. Участвующий в сборе мокроты медицинский работник помимо халата и шапочки должен быть в маске-респираторе, резиновых перчатках и резиновом фартуке. Он должен находиться за спиной больного,

выбирая свое положение таким образом, чтобы направление движения воздуха было от него – к больному. Медицинский работник должен открыть контейнер для сбора мокроты, снять с него крышку и передать больному донную часть контейнера.

В идеальном случае пациент откашливает 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 контейнер для сбора мокроты, не открывая его, и наблюдать за процессом сбора мокроты через стекло.

3. Стоя позади пациента либо в изолированной части комнаты, медицинский работник наблюдает за сбором мокроты. Медработнику следует рекомендовать пациенту держать контейнер как можно ближе к губам и сразу же сплевывать в него мокроту по мере ее откашливания. Выделение мокроты усиливается после одного или нескольких глубоких вдохов.

4. По завершении процедуры сбора мокроты медицинский работник должен закрыть контейнер крышкой (или проверить, насколько плотно его закрыл пациент) и оценить количество и качество собранной мокроты.

Если мокроту получить не удалось, контейнер считается использованным и подлежит обеззараживанию.

Контейнер с порцией мокроты достаточного объема (не менее 3–5 мл), содержащей уплотненные или гнойные комочки без слюны, тщательно закрывают завинчивающейся крышкой, затем контейнер маркируют и помещают в специальный бикс для транспортировки в лабораторию.

1.3.3. Хранение и транспортировка мокроты

Собранный материал необходимо как можно быстрее доставить в лабораторию на исследование. *Срок хранения материала в нативном виде при комнатной температуре не должен превышать 24 часа.*

Если в медицинском учреждении не проводятся микроскопические исследования по выявлению кислотоустойчивых микобактерий, собранный диагностический материал должен доставляться в централизованную лабораторию. Доставка должна осуществляться 1–2 раза в неделю при условии обязательного сохранения материала в холодильнике при 4 °С в промежутках между доставками.

Рекомендуется до момента отправки в лабораторию хранить герметично закрытые контейнеры с мокротой в вертикальном положении в специально отведенном для этих целей холодильнике, который по окончании каждого рабочего дня опечатывается и запирается. Срок хранения материала в холодильнике без добавления консервирующих средств не должен превышать 72 часа.

Для транспортировки материала рекомендуется пользоваться биксами или специальными транспортировочными ящиками с мягкими, легко стерилизующимися прокладками на дне и с гнездами или прокладками для контейнеров. Прокладки, предохраняющие контейнеры от повреждений, 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. Во избежание протечки жидких материалов и нарушения целостности контейнеров последние должны быть закреплены в транспортировочных ящиках в вертикальном положении.

При транспортировке для каждого бикса с контейнерами для сбора мокроты оформляется сопроводительный список, в который из регистрационного журнала медицинского учреждения переносятся данные о пациентах. Образец сопроводительного листа (форма 04-2-ТБ/у) представлен ниже, в разделе 3.7.3.

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

Перед отправкой собранного материала медицинский работник должен проверить:

- 1) соответствует ли количество контейнеров с мокротой их количеству, указанному в сопроводительном списке;
- 2) соответствует ли номер каждого контейнера номеру, указанному в списке;
- 3) имеются ли в списке все необходимые данные о каждом пациенте.

После проверки в сопроводительном списке медработник:

- указывает дату отправки материала на исследование и ставит свою подпись;
- вкладывает в чистый конверт сопроводительный список и заполненные бланки направлений на микроскопическое исследование на каждую пробу материала и прикрепляет конверт к биксу снаружи (во избежание инфицирования бланков направлений и сопроводительных документов);
- тщательно закрывает бикс.

2 Организация работы лаборатории для проведения микроскопического исследования

2.1. Меры безопасности в центре микроскопии

Возбудитель туберкулеза относится к III группе учета патогенности, согласно Санитарным правилам СП 1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами», а также по классификации ВОЗ 1983 года, к которой относятся инфекции, передающиеся воздушно-капельным или аэрозольным путем.

2.1.1. Пути распространения инфекции

В лаборатории возможны следующие пути распространения туберкулезной инфекции.

1. Воздушно-капельный (аэрозольный) путь заражения.

Аэрозольный путь заражения является основным путем распространения туберкулезной инфекции.

Большинство случаев инфицирования в лаборатории происходит из-за недооценки опасности образования инфекционных аэрозолей, содержащих МБТ.

Аэрозоли образуются в ходе многих манипуляций (при переливании жидкостей, при ударе капли жидкости о поверхность). Крупные капли аэрозоля (диаметром 5 мкм и более) быстро оседают из воздуха и загрязняют кожу, одежду и поверхности оборудования, однако наиболее опасны крошечные капельки размером менее 5 мкм, содержащие жизнеспособные МБТ. Такие мельчайшие аэрозольные частицы могут находиться в воздухе неопределенно долгое время, при вдыхании они проникают в альвеолы легких, где оседают и могут вызвать инфекционный процесс (рис. 6).

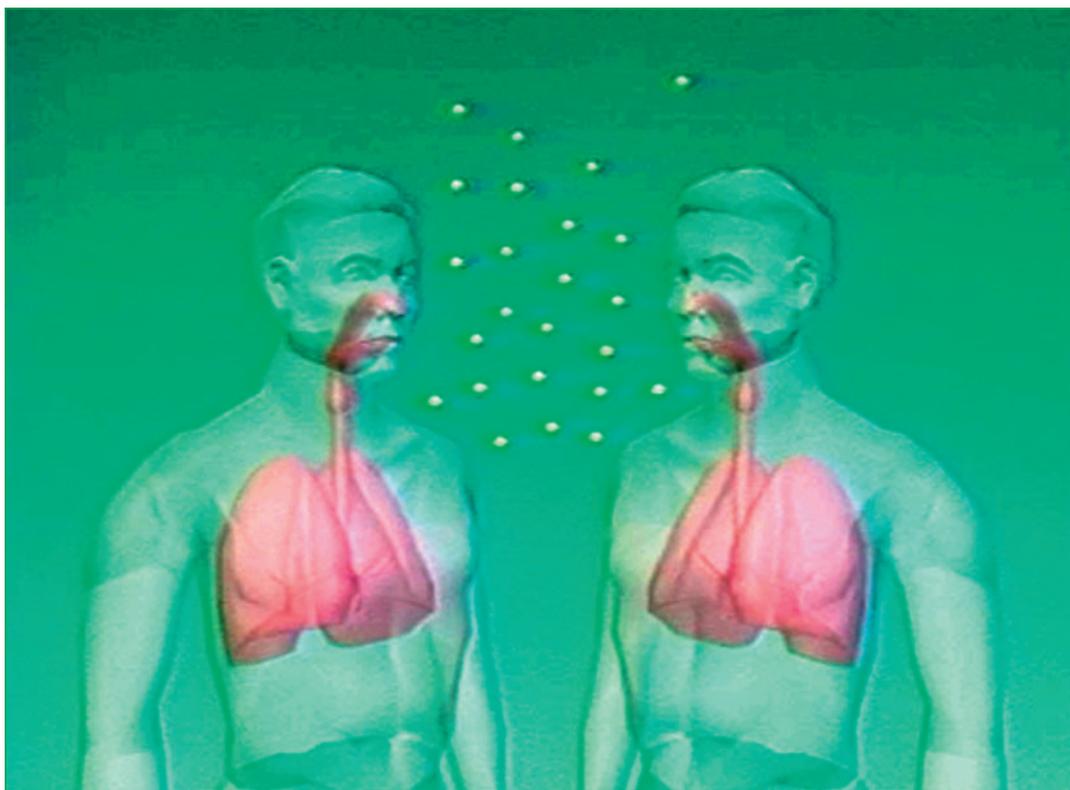
Число бактерий, необходимых для инфицирования человека, – менее 10. Инфицирующие частички попадают в воздух лаборатории при выполнении процедур, создающих аэрозоль. При высыхании аэрозоля формируются частички размером 1–5 мкм, способные оставаться в воздухе длительное время.

В целях безопасности необходимо:

- минимизировать образование и рассеивание аэрозоля;
- оградить лабораторных работников от вдыхания аэрозольных частиц.

Аэрозоль образуется в процессе следующих манипуляций.

- *Сбор мокроты* от кашляющих больных.
- *Подготовка препаратов, нанесение мазков.* Открывание контейнеров с материалом, разбор материала и нанесение материала на предметное стекло – это наиболее опасные виды работ, которые должны проводиться под вытяжным устройством или с использованием безопасного оборудования (например, хими-



Воздушно-капельный (аэрозольный) путь заражения туберкулезом **Рис. 6**

ческий вытяжной шкаф). Необходимо следить за тем, чтобы фиксация препаратов над пламенем горелки (или спиртовки) производилась только после их полного высыхания.

- *Работа с бактериологической петлей.* Обращаться следует аккуратно, избегая энергичных и резких движений. Петля с культурой или остатками диагностического материала в первую очередь очищается во флаконе с песком и 70% спиртом (слой песка должен быть не менее 3 см, слой спирта над песком – не менее 3 см). Затем в пламени спиртовки петля прокаливается до покраснения.
- *Переливание инфицированных жидкостей.* При переливании инфицированного материала в дезинфектант может произойти разбрызгивание и образование аэрозоля. Использование воронки с опущенным в жидкость концом позволит избежать этого.

2. Риск алиментарного заражения в лаборатории.

Инфицирование может произойти при засасывании инфицированной жидкости пипеткой или в результате занесения инфекционного агента в рот грязными руками.

Руки можно испачкать не только в боксе, но и о наружную поверхность контейнера для мокроты. Рекомендуется работать с контейнерами в перчатках, проводить обработку контейнеров дезсредствами снаружи и часто мыть руки.

3. Контактное заражение.

Возможен укол иглой, загрязненной МБТ, поэтому избегайте использования шприцев с иглами вместо пипеток. Возможны также порезы об отбитые края стек-

лянной посуды или пипеток. Следует избегать использования битой посуды. Наиболее опасны пастеровские пипетки, поэтому по возможности нужно использовать пластиковые пастеровские пипетки.

2.1.2. Обеспечение биологической безопасности

Меры по обеспечению биологической безопасности должны быть направлены на защиту как персонала, так и окружающей среды.

Основной способ защиты персонала от аэрозольной инфекции – удаление инфекционного аэрозоля потоком воздуха

В соответствии с Приказом МЗ РФ № 380 клинично-диагностические лаборатории лечебно-профилактических учреждений должны быть оборудованы химическими вытяжными шкафами, подключенными к вытяжной локальной вентиляции. Жела-



Рис. 7 Работа с инфекционным материалом в ламинарном шкафу биологической безопасности. Использование индивидуальных средств защиты (маска-респиратор, перчатки, халат, шапочка, рабочий костюм)

тельно 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, подготовку материала и приготовление мазков для микроскопического исследования на кислотоустойчивые микобактерии рекомендуется проводить в ламинарном шкафу биологической безопасности (рис. 7).

Помимо инженерных средств обеспечения безопасности от аэрозольной инфекции в каждой лаборатории должны быть средства индивидуальной защиты – такие, как защитная маска, перчатки, халат, шапочка (рис. 7), обеспечивающие защиту персонала лаборатории от инфицирования в случае аварии, а также при невозможности обеспечить достаточную инженерную защиту персонала при выполнении опасных манипуляций.

Персональные защитные маски следует надевать при выполнении процедуры приготовления мазков из мокроты, а также в процессе приема, осмотра и разбора поступающего в лабораторию диагностического материала.

Внимание!

Марлевые повязки, а также защитные персональные маски типа матерчатых или бумажных хирургических (рис. 8) не задерживают наиболее опасные аэрозольные частицы размером менее 5 мкм



Обычная медицинская маска **Рис. 8**

Для индивидуальной защиты при высоком риске заражения (комнаты сбора мокроты, микробиологические лаборатории противотуберкулезной службы) необходимо использовать НЕРА-маски, изготовленные из нетканого материала, задерживающего 99,98% аэрозольных частиц размером менее 5 мкм. Например, маски 9332 (3М, США) или № 95, № 99 (США) или аналогичные (рис. 9).

Эффективность масок-респираторов снижается при увлажнении и загрязнении, поэтому их рекомендуется использовать одноразово.



Рис. 9 Защитная маска-респиратор

Чтобы предотвратить распространение инфекции *алиментарным путем*, необходимо находиться в лаборатории в спецодежде: в халате, шапочке или косынке.

При приеме материала лаборант должен работать в резиновых перчатках. Одноразовые перчатки не следует мыть или использовать повторно.

Все процедуры с инфицированным материалом в лаборатории микроскопии следует производить только в резиновых перчатках!

В каждой лаборатории работа должна быть организована в соответствии с требованиями органов Госсанэпиднадзора. Необходима инструкция по технике безопасности, содержащая информацию о факторах опасности для данной лаборатории, мерах предосторожности и план действий при возникновении аварии, направленных на ее ликвидацию и обеспечение безопасности персонала.

Никакое самое дорогое и современное оборудование не заменит соблюдения мер безопасности!
Неукоснительное соблюдение мер безопасности и производственной гигиены – обязанность каждого работника лаборатории.

Лабораторная гигиена

Вход посторонних лиц в лабораторию категорически воспрещен!

Запрещается принятие пищи, курение и наложение макияжа в лаборатории.

Запрещается втягивать ртом жидкости в пипетку, смачивать языком наклейки.

Необходимо частое мытье рук с мылом (после выхода из «заразной» зоны, касания потенциально заразных предметов при выполнении любой работы, снятия защитной одежды). Для вытирания рук рекомендуется использовать одноразовые салфетки или бумажные полотенца. Обработку открытых поверхностей кожи можно проводить 70% этиловым спиртом.

Все поверхности в лаборатории должны подвергаться регулярной дезинфекции с использованием соответствующих средств.

Полы лаборатории не следует натирать или подметать; во избежание образования лишней пыли в лаборатории следует ежедневно производить только влажную уборку.

Дезинфекция воздуха и поверхностей помещений с помощью ультрафиолетового излучения должна проводиться после просушки помещений.

Уборка помещений лаборатории производится регулярно, в соответствии с утвержденным графиком. Рабочие поверхности столов следует обрабатывать не менее 1 раза в день раствором дезинфектанта.

2.1.3. Стерилизация и дезинфекция

Стерилизация означает полное уничтожение биологических объектов, в то время как дезинфекция подразумевает уничтожение патогенных микроорганизмов, являющихся этиологическим фактором инфекционных заболеваний. Стерилизация осуществляется при использовании определенного температурного режима, вызывающего гибель микроорганизмов, дезинфекция – химическими веществами в установленных концентрациях и определенной экспозиции.

Дезинфицирующие средства

Наиболее распространенными способами обеззараживания зараженных объектов, используемыми при проведении противотуберкулезной обработки, являются методы автоклавирования, кипячения, а также метод погружения (заливание или засыпание) инфицированной лабораторной посуды и материалов в раствор дезинфицирующего средства.

Дезинфицирующие средства применяются также для протирания и орошения поверхностей помещений.

Вплоть до последнего времени общепринятыми, широко известными и наиболее употребляемыми при проведении противотуберкулезной обработки дезинфектантами в течение многих лет являлись средства на основе таких соединений, как хлор, фенол, спирт, йодофор, глутаровый альдегид, формальдегид и др.

Стандартные дезинфицирующие средства, рекомендованные к применению в противотуберкулезных учреждениях РФ для противотуберкулезной обработки, их дей-

твующие бактерицидные концентрации и время воздействия, а также способы дезинфекции, которые могут использоваться в лабораториях, работающих с возбудителем туберкулеза, приведены в табл. 1.

Все дезинфектанты, перечисленные ниже, токсичны, и чрезмерная экспозиция может привести к респираторным нарушениям, кожным реакциям и конъюнктивиту. Однако при следовании указаниям производителя они вполне безопасны и эффективны.

Таблица 1

Стандартные дезинфицирующие средства и способы дезинфекции, применяемые в лабораториях противотуберкулезной службы

| Наименование дезинфицирующего средства | Концентрация (в %) | Время обработки (в мин) |
|--|--------------------|-------------------------|
| Хлорамин (активированный хлорамин) | 5 (2) | 360 |
| Хлорная известь | 10–20 | 60 |
| Перекись водорода | 3 | 180 |
| Гипохлорит | 1–5 | 15–30 |
| Активированный глутаровый альдегид | 2 | 15–60 |
| Этиловый спирт | 70 | 15–60 |
| Йодофор | 3–5 | 15–30 |
| Автоклавирование, 126 °С | – | 60 |
| Метод кипячения | – | 60 |
| Метод кипячения с гидрокарбонатом натрия | 2 | 45 |

Приготовление дезинфицирующих растворов

Хлорамин

А) 5% хлорамин. 50 г хлорамина Б растворить в 1 л воды до полного исчезновения мутности раствора. Срок хранения – 10 дней.

Б) Активированный хлорамин (2%):

- 20 г хлорамина Б растворить в 1 л воды. Добавить к раствору 20 г сернокислого или хлористого аммония, энергично перемешать и немедленно использовать;
- 20 г хлорамина Б растворить в 1 л воды. Добавить равный объем нашатырного спирта, перемешать и немедленно использовать.

Рекомендуется смачивать хлорамином бумажные полотенца и накрывать ими рабочую поверхность, что уменьшит образование аэрозоля в случае пролития инфицированных жидкостей.

Хлорная известь

А) Хлорная известь с 20–25% активного хлора (хранится в плотно закупоренной таре, в сухом, прохладном, темном помещении) или хлорно-известковое молоко (10–20% взвесь хлорной извести в воде). 100–200 г хлорной извести на 1–2 л воды. Высыпать известь в эмалированную посуду, влить небольшую отмеренную часть воды, тщательно размешать деревянной лопаткой до получения кашицеобразной массы и постепенно при постоянном помешивании прибавить остальную часть воды. Хранение – не более 7 дней.

Б) Осветленный раствор хлорной извести. Приготовить 10% раствор хлорно-известкового молока и оставить в закрытом сосуде на 1 сутки. Верхний слой слить, про-

фильтровать через несколько слоев марли и хранить в закрытом сосуде. Хранение – не более 7 дней.

В) *Сухая хлорная известь*. Используется для дезинфекции жидких субстратов из расчета 10–20 г на 100 мл субстрата.

Гипохлорит следует использовать в концентрации от 1% до 5%, время контакта 15–30 минут, в зависимости от типа и объема материала. Растворы гипохлорита (5%) подходят для дезинфекции органических остатков, благодаря способности растворять органику.

Глутаровый альдегид не требует разведения, но требует активации (активирующая добавка поставляется производителем отдельно от основного раствора). Обычно глутаровый альдегид поставляется в виде 2% раствора, активатором является бикарбонатное составляющее. Подходит для обработки рабочих поверхностей и посуды. Активированный раствор используется 2 недели и выливается, если помутнеет.

70% спирт используется для обработки поверхностей, для обработки петли во флаконе с песком. Эффективным методом обеззараживания загрязненных рук является обработка их 70% спиртом, после чего рекомендуется мытье рук с мылом.

Йодофор используется в концентрациях от 3% до 5%, время контакта 15–30 минут, в зависимости от типа и объема материала. Является подходящим средством для дезинфекции пролитого материала. Препараты йодофора используются для вытирания поверхностей при разбрызгивании инфицированных жидкостей, а также для мытья рук.

Содовый и мыльно-содовый растворы для кипячения

А) *2% содовый раствор* – 20 г гидрокарбоната натрия растворяют в 1 л воды.

Б) *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.

В последние годы в продаже появилось большое количество новых современных дезинфицирующих средств, не содержащих хлор и другие токсичные вещества.

Например, в настоящее время на рынке дезинфектантов широко представлены отечественные и зарубежные средства, имеющие в качестве действующего вещества четвертичные аммониевые соединения, а также дезинфицирующие средства на основе полигексаметилгуанидина. Кроме того, имеется большое количество антисептических препаратов на смешанной основе, например, содержащих в качестве действующего вещества (3-аминопропил) додецеламин [третичный алкиламин] плюс вспомогательные ингредиенты, чаще всего поверхностно-активные вещества.

По степени воздействия на организм современные дезинфицирующие средства относятся к классу малоопасных веществ, что является их преимуществом перед классическими дезинфектантами. Однако следует помнить, что, хотя современные препараты активны в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, не все они оказывают туберкулоцидное действие.

Антибактериальное действие дезинфектантов (действующие концентрации, продолжительность воздействия и влияние органических остатков) различается для разных видов микроорганизмов. Неверно достаточно распространенное мнение о том, что дезинфицирующие средства, эффективные против различных видов микроорганизмов и вирусов, столь же эффективны и против микобактерий туберкулеза. Це-

лый ряд предлагаемых на современном рынке дезинфицирующих средств обладают незначительной или не обладают вовсе активностью в отношении МБТ. Поэтому перед применением каких-либо новых дезинфицирующих средств необходимо тщательно изучить инструкцию.

Ниже описаны некоторые современные дезинфицирующие средства, прошедшие тест-контроль в НИИ дезинфектологии и ЦНИИ туберкулеза РАМН. Они обладают бактерицидным действием в отношении лабораторных и клинических штаммов микобактерий туберкулеза при указанных режимах дезинфекции, имеют Свидетельство о Государственной регистрации дезинфицирующего средства МЗ и СР РФ и могут быть рекомендованы к применению их в противотуберкулезных учреждениях РФ для использования в лабораториях, работающих с возбудителем туберкулеза.

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.

Дезинфицирующие средства, в состав которых в качестве действующего вещества входит ***N,N*-бис-(3-аминопропил) додециламин (амин)** – 7,5%, а также вспомогательные компоненты, отдушка, краситель и вода до 100% (например, такое средство как мистраль), рекомендуется использовать в концентрации 3–4%, при этом время дезинфекции составляет 30–90 минут.

Что касается антисептических средств, имеющих в качестве действующего вещества **четвертичные аммониевые соединения** (ЧАС), то обычно в состав такого средства входит комплекс из 2, 4 и даже 6 ЧАС, что снижает способность микроорганизмов привыкать к рецептуре и уменьшает распространение микроорганизмов, резистентных к тому или иному ЧАС.

Наиболее выраженным бактерицидным действием в отношении штаммов микобактерий туберкулеза обладают, в частности, такие средства на основе ЧАС, как «Дезэффект» и «Дезэффект-санит». «Дезэффект» представляет собой композицию, содержащую в качестве действующих веществ комплекс 2 четвертичных аммониевых соединений – *n*-алкилдиметилбензиламмоний хлорид (4,5%), *n*-алкилдиметил(этилбензил)аммоний хлорид (4,5%) и другие компоненты. Рекомендуемый режим дезинфекции: концентрация средства – 3,8%, время обработки – 60–120 минут. В состав средства «Дезэффект-санит» входят шесть четвертичных аммониевых соединений (3,8%) в качестве действующих веществ, а также различные вспомогательные компоненты. В состав смеси этих ЧАС входят октилдецилдиметиламмоний хлорид (30,0%), тетрадецилдиметилбензиламмоний хлорид (20,0%), додецилдиметилбензиламмоний хлорид (16,0%), диоктилдиметиламмоний хлорид (15,0%), дидецилдиметиламмоний хлорид (15,0%) и гексадецилдиметилбензиламмоний хлорид (4,0%). Рекомендуемый режим дезинфекции: концентрация средства – 5–10 %, время обработки – 60–120 минут.

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

После приготовления рабочего раствора дезинфектанта необходимо указать на емкости с дезсредством дату изготовления раствора и срок хранения. Растворы дезинфицирующих средств не следует хранить в разбавленном виде долгое время, так как это снижает их активность. Желательно ежедневно готовить необходимое количество свежих дезинфицирующих веществ.

При приготовлении и использовании рабочих растворов дезинфицирующих средств необходимо строго соблюдать режимы дезинфекции, а именно процентное содержание средства и время обеззараживания, указанные в инструкции по применению дезсредства в противотуберкулезных учреждениях.

Не следует также пользоваться сильноароматизированными антисептиками во избежание аллергических реакций (головная боль, тошнота и т. п.).

Автоклавирование

Для обеззараживания загрязненной посуды и материала может быть использован такой метод, как автоклавирование. Отработанную посуду помещают в автоклав и проводят ее стерилизацию при определенном режиме.

Автоклавирование является оптимальным стерилизационным методом, поэтому персонал должен быть обучен правильной работе этим методом. Автоклав должен находиться внутри лаборатории для предотвращения выноса контаминированных материалов за ее пределы. В случае если автоклав находится вне лаборатории, потенциально инфицированный материал должен доставляться туда в закрытых биксах (контейнерах, ведрах, баках).

Автоклавы следует периодически тестировать для гарантии того, что в них создается необходимая температура. Тестирование следует проводить с использованием индикаторных капсул или бумаги, меняющих цвет при правильном проведении стерилизационного процесса.

Автоклавирование с целью стерилизации инфицированных материалов следует проводить при температуре 126 ± 2 °C ($1,5$ кгс/см²) в течение 60 минут.

Согласно рекомендациям ВОЗ и Международного союза по борьбе с туберкулезом, для обеззараживания одноразовых пластиковых контейнеров для сбора мокроты можно использовать более мягкий режим автоклавирования – при температуре 121 °C (1 атмосфера) в течение 20 минут, что позволяет избежать слипания и склеивания пластика в процессе автоклавирования.

Одноразовые материалы после автоклавирования сжигаются либо утилизируются иным способом. Стеклопосуда моется, стерилизуется и может использоваться повторно.

Кипячение и сжигание

В периферических лабораториях может не быть автоклавов, поэтому необходимы альтернативные пути обеззараживания одноразовых и стеклянных контейнеров для мокроты и других материалов.

Простейший метод – это кипячение. Для этой цели можно использовать обычную сковородку, однако ее объем ограничен. Для кипячения может быть также использо-

ван бак, сделанный из металлической бочки. В этом баке можно обеззаразить материал перед мытьем или сжиганием путем кипячения в течение 60 минут в воде или в течение 45 минут в 2% мыльно-содовом растворе.

Одноразовые пластиковые контейнеры, горючие отходы после обеззараживания должны сжигаться. Сжигание необходимо производить в печах или в специальных металлических бочках.

Процедура обеззараживания использованных контейнеров (флаконов) с мокротой:

- ящики с контейнерами помещают на специально отведенный для этого стол, покрытый жестью, который устанавливают около плиты с баком для кипячения мокроты;
- металлический бак (достаточно вместительных размеров) устанавливают на плите и наливают в него 2% мыльно-содовый раствор;
- контейнеры осторожно открывают (работать в перчатках) и вместе с мокротой опускают пинцетом в воду;
- доливают 2% мыльно-содовый раствор, чтобы контейнеры во время нагревания были полностью покрыты кипящей жидкостью; наливать мыльно-содовый раствор в бак до краев нельзя, так как во время кипения мокроты образующаяся пена не должна выплескиваться;
- бак закрывают крышкой и нагревают до кипения мыльно-содового раствора; для обеззараживания производят кипячение в течение 45 минут с момента закипания;
- после кипячения содержимое контейнеров сливают в канализацию; стеклянные флаконы многоразового использования и бак вновь промывают 2% содовым или 2% мыльно-содовым раствором, а затем промывают проточной водой;
- промытые флаконы опрокидывают на подносы для стекания с них воды и подсушивают при комнатной температуре; для повторного использования стеклянные флаконы стерилизуют в сухожаровом шкафу при температуре 160–180 °С в течение 1 часа с момента установления температуры;
- столы и ящики обрабатывают 5% раствором хлорамина (смачивают и оставляют в таком состоянии на 6 часов), а затем промывают теплым 2% содовым раствором.

Удаление отработанных и контаминированных материалов

При необходимости транспортировки инфицированного материала в другую лабораторию он должен покидать лабораторию только тщательно упакованным. Весь патологический материал, культуры, мазки и контейнеры должны быть дезинфицированы или стерилизованы перед удалением.

Выброс загрязненных лабораторных материалов

В зоне приготовления мазков в течение всего рабочего времени должен находиться контейнер с дезраствором, куда помещают использованные пипетки, пробирки и петли. Контейнер должен быть достаточно глубокий, чтобы удаляемые предметы полностью погружались в раствор. Использованные пипетки, петли и другие предметы следует погружать в дезраствор на время, обеспечивающее их стерилизацию, после чего они могут быть вымыты, простерилизованы и использованы вновь.

В непосредственной близости от рабочего места для приготовления мазков должно находиться стальное нержавеющее ведро с крышкой (бикс), куда помещают отработанные контейнеры с инфицированным материалом.

Загрязненные жидкости следует сливать в автоклавируемые емкости (контейнеры) и выливать в канализацию **после обеззараживания (автоклавированием, кипячением или дезинфицирующим средством, например хлорной известью).**

Пинцеты, сушилки, мостики, кюветы и лотки по окончании работы обрабатывают пламенем или заливают раствором дезинфектанта.

Стекланную посуду по возможности следует заменять пластиковой. Разбитую, имеющую сколы и/или трещины посуду следует выбрасывать, предварительно простерилизовав.

Внутри лаборатории все инфицированные материалы должны перемещаться в закрытых контейнерах, согласно принципу поточности.

Процедуру обеззараживания инфицированных материалов и контейнеров с мокротой проводят следующим образом. Бачок или ведро, содержащие использованные материалы и контейнеры с мокротой, заполняют дезинфицирующей жидкостью из расчета 1:1 (1 объем мокроты + 1 объем дезинфектанта), закрывают крышку и выдерживают положенный срок или условия обработки (например, экспозиция с 5% раствором хлорамина – 360 минут или кипячение в 2% мыльно-содовом растворе в течение 45 минут с момента закипания).

Контейнеры для мокроты

Пластиковые контейнеры следует уничтожить сжиганием после предварительной стерилизации; стеклянные флаконы подлежат кипячению (45–60 мин), предпочтительно автоклавированию (при 126 °С – 60 минут), после чего они должны быть вымыты, простерилизованы и могут использоваться вновь.

Петли, палочки

Деревянные палочки, бумагу сжигают после обработки дезинфектантом или автоклавирования. Загрязненные петли и пипетки погружаются в дезинфицирующий раствор (время экспозиции зависит от вида дезинфицирующего средства), после чего они моются и стерилизуются.

Положительные и отрицательные мазки

Положительные мазки следует подвергнуть дезинфекции, а затем обязательно уничтожить во избежание повторного использования.

Стекла с отрицательными мазками также рекомендуется использовать одноразово, однако при необходимости они могут использоваться вновь (для проведения лабораторией других клинических исследований) после надлежащей 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 спиртоэфирной смеси Никифорова не менее 24 часов.

Организация сбора, хранения, сортировки, обеззараживания и стирки халатов

Выходя из лаборатории, сотрудники должны снять и оставить в ней халат. Вешалка для халатов должна быть отделена от вешалки для верхней одежды сотрудников.

Запрещается уносить халаты домой и выходить в них за пределы лаборатории. Халаты следует менять не реже 1 раза в неделю или по необходимости.

Стирку халатов следует производить после предварительного замачивания их в дезинфицирующем растворе:

- грязные халаты складывают в специальные брезентовые или прорезиненные мешки или просто в наволочку; строго запрещается сбрасывать халаты на пол, перетряхивать их;
- халаты обеззараживают путем замачивания в 5% растворе хлорамина в течение 4 часов (5 литров раствора на 1 кг белья) или в 1% активированном растворе хлорамина в течение 2 часов. После этого белье кипятят в 2% растворе кальцинированной соды или 0,5% растворе любого моющего средства в течение 15 минут, а затем стирают обычным способом.

Вопросы

1. Назовите основной путь распространения туберкулезной инфекции.
2. Перечислите другие возможные пути инфицирования туберкулезом в клинико-диагностической лаборатории.
3. Назовите основные меры безопасности при работе с диагностическим материалом, инфицированным возбудителем аэрозольной инфекции.
4. Перечислите основные методы дезинфекции, применяемые при работе с объектами, потенциально инфицированными микобактериями туберкулеза.
5. Опишите, какой обработке вы подвергнете многоразовые (стеклянные) контейнеры с мокротой после приготовления мазка и его просмотра.

2.2. Помещение центра микроскопии

Помещение, в котором размещается центр микроскопии, должно быть сухое, с хорошей вентиляцией (наличие вытяжного шкафа, вытяжной вентиляции), хорошо освещенное. Стены, потолок и полы должны быть покрыты гладким, не адсорбирующим материалом, который можно легко мыть и дезинфицировать. Кроме того, этот материал должен быть устойчивым к химическим реактивам, используемым в лаборатории. Пол не должен быть скользким, межкомнатные пороги должны отсутствовать.

Помещение для микроскопических исследований должно быть снабжено водопроводом и канализацией. При недостаточной очистке водопроводной воды, поступающей в лабораторию, необходимо предусмотреть обеспечение лаборатории дистиллированной водой в достаточном количестве для промывания мазков. Кроме того, дистиллированная вода необходима для приготовления растворов для окрашивания мазков.

Центры микроскопии, выполняющие микроскопические исследования мазков, окрашенных методом Циля–Нильсена, должны располагать помещением, обеспечивающим проведение следующих производственных операций:

1. Прием диагностического материала, осмотр и регистрация поступающих образцов.
2. Приготовление, сушка, фиксация и окраска мазков; дезинфекция.

3. Микроскопическое исследование мазков.

4. Учет и регистрация результатов исследования, приготовление реактивов.

Таким образом, помещение центра микроскопии должно состоять из нескольких комнат или быть разделено на рабочие зоны и иметь, по крайней мере, 2 раковины (лабораторную и для мытья рук) и 4 изолированных рабочих места.

Отдельные рабочие места должны быть связаны между собой единой эпидемиологической цепочкой. Технологический цикл лабораторного процесса должен быть построен таким образом, чтобы исключить попадание чистых материалов в инфицированную зону. В свою очередь, инфицированные материалы должны быть максимально локализованы в отведенной для них зоне.

Центр микроскопии мазков, окрашенных методом Циля–Нильсена, может функционировать на базе уже существующей в лечебно-профилактическом учреждении клиничко-диагностической лаборатории, при условии что данная лаборатория располагает необходимым для этого набором помещений с достаточной площадью.

В этом случае часть производственных помещений лаборатории (прием анализов, микроскопная, моечная, стерилизационная) и часть вспомогательных помещений могут быть общими (в том случае если эти помещения имеют достаточную площадь для размещения в них нескольких профильных лабораторий). При этом желательно, чтобы работа, связанная непосредственно с инфекционным материалом (манипуляции по приготовлению мазков из нативной мокроты, их фиксация и окрашивание), выполнялась отдельно от других клинических исследований, с использованием индивидуального оборудования, в отдельном производственном помещении, площадь которого должна быть достаточна для размещения рабочих мест и соответствующего оборудования.

Выделение специальной комнаты для проведения исследований мокроты методом прямой микроскопии мазка, окрашенного по Цилю–Нильсену, отдельно от остальных клинических исследований в наибольшей степени позволяет обеспечить безопасность проведения данного анализа.

В том случае если общая площадь имеющейся в учреждении клиничко-диагностической лаборатории не позволяет разместить на ее базе центр микроскопии, рекомендуется выделить для его организации совершенно отдельное помещение (не зависимое от клиничко-диагностической лаборатории) общей площадью около 50 м². Таким образом, функционируя на базе лечебно-профилактического учреждения, территориально центр микроскопии будет расположен отдельно от имеющейся в лечебно-профилактическом учреждении клиничко-диагностической лаборатории и будет работать независимо от нее, выполняя только исследования по выявлению кислотоустойчивых микобактерий.

При размещении центра микроскопии в отдельном от имеющейся клиничко-диагностической лаборатории помещении предпочтительным является наличие в нем нескольких комнат (или зон), которые позволят разделить манипуляции с высоким и низким уровнем инфицирования персонала.

1. Прием анализов.

В этой зоне должен находиться рабочий стол для приема, осмотра и последующей регистрации поступающих образцов, а также полка для хранения бланков с результатами анализов. Наилучший способ подачи образцов в лабораторию – через специальное окно для приема образцов.

2. *Комната для приготовления, фиксации и окраски мазков*, где должны находиться:
- вытяжной шкаф для приготовления, сушки и окраски мазков;
 - контейнер для отработанных инфекционных материалов;
 - вспомогательный рабочий стол;
 - лабораторная раковина;
 - раковина для мытья рук;
 - УФ-облучатель.

Кроме того, в данном помещении могут находиться:

- сухожаровой шкаф (для фиксации мазков);
- холодильник (для хранения проб мокроты).

«Чистый» холодильник для хранения реактивов (в частности, фенола), а также шкаф для реактивов и рабочий стол с весами размещают в зависимости от площади имеющихся помещений: либо в данной комнате, либо в других помещениях (что является более предпочтительным), например в микроскопной или моечной комнате. Принимая решение по данному вопросу, следует учитывать необходимость соблюдать эпидемиологическую и технологическую цепочки.

3. *Микроскопная комната*, в которой должны находиться:

- стол для микроскопии;
- стол для учета и регистрации результатов исследования;
- шкафчик для хранения исследованных препаратов;
- раковина для мытья рук.

4. *Моечная комната*. В этой комнате должны находиться:

- мойка;
- дистиллятор;
- шкаф для посуды;
- сухожаровой шкаф для стерилизации.

5. *Комната для персонала*.

Вопросы

1. Перечислите основные требования к помещению для проведения исследования мокроты по Цилю–Нильсену.
2. Опишите функциональные зоны центра микроскопии.

2.3. Оборудование и реактивы

2.3.1. Список оборудования и реактивов

Ниже (табл. 2) приведен минимальный список оборудования и реактивов, необходимых для проведения микроскопического исследования мокроты методом прямой микроскопии мазка, окрашенного по Цилю–Нильсену.

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

Список оборудования, лабораторной посуды, расходных материалов, реактивов и прочего, представляющий минимальную потребность лаборатории микроскопии с нагрузкой 4000 мазков в год

| Наименование | Расход на 1 мазок | Количество в год |
|--|---|--|
| Оборудование Микроскоп бинокулярный с иммерсионным объективом (×90–100) и окулярами (×8 или ×10) Горелка Бунзена или спиртовка Дистиллятор Весы с точностью до 0,01 г Таймер 0–60 мин или песочные часы на 5, 3 и 1 минуту Вытяжной шкаф лабораторный | | 1 1 1 1 1 1 |
| Лабораторная посуда, расходные материалы Бутыли темного стекла, 200–300 мл Сосуд для кипячения, 1 л Эксикатор с притертой крышкой или емкости размером 50×30 см Ведро пластиковое или эмалированное, 12 л | | 3 2 4 4 |
| Воронки химические, 45 или 60 мм в диаметре – II –, 90–125 мм в диаметре Цилиндр мерный, 100 мл Колба химическая мерная, 500 мл Колба химическая из термостойкого стекла, 250 мл Стакан химический из термостойкого стекла, 500 мл Капельницы пластиковые, 10 мл Промывочные (дозировочные) бутылки, 100 мл Промывочные бутылки пластиковые, 500 мл Пинцет из нержавеющей стали, 15 см Ножницы из нержавеющей стали, 25 см Штативы для сушки мазков, 12–25 мазков Коробки для хранения мазков, 12–100 мазков Штатив для окраски мазков Контейнеры для мокроты многоцветные Держатель для микробиологической петли | | 3 3 1 2 2 2 2 4 2 1 1 2 20–4 1 1000 5 |
| Расходные материалы и реактивы Предметные стекла, 25×75 мм, 1,1 – 1,3 мм толщиной (на 1 год) Вата хлопковая Восковые карандаши, или алмазные ручки, или несмываемые водой фломастеры Фильтровальная бумага, фильтры диаметром 15 см №1 Перчатки резиновые Салфетки для линз Шариковая ручка, черная или синяя Шариковая ручка красная Петля бактериологическая, нихромовая, 1 мм диаметром Деревянные палочки-апликаторы | 1 – – 0,000007 кор. – 0,0001 кор. – – – – 1 | 5 000 1 кг 5/2 8 кор. 400 пар 4 кор. 8 4 10 5 000 |
| Регистрационные формы Форма направления на анализ 05-ТБ/у Форма ответа 05-ТБ/у Лабораторный журнал 04-ТБ/у | 0,3 0,3 – | 2000 2000 5 |

| Наименование | Расход на 1 мазок | Количество в год |
|--|-------------------|------------------|
| Реактивы | | |
| Фуксин основной, х. ч. | 0,015 г | 100 г |
| Спирт этиловый, 96%, х. ч. (для приготовления спиртового раствора фуксина) | 0,5 мл | 2 л |
| Фенол кристаллический, х. ч. | 0,25 г | 1 кг |
| Метиленовый синий, х. ч. | 0,015 г | 100 г |
| Реактивы для обесцвечивания: | | |
| – серная кислота, 96%, х. ч. | 1,25 мл | 5 л |
| или | | |
| – солянокислый спирт 3%: | | |
| – соляная к-та, конц., х. ч. | 0,15 мл | 0,6 л |
| – спирт этиловый, 96%, х. ч. | 4,85 мл | 20 л |
| Спирт этиловый технический | 1,5 мл | 6 л |
| Иммерсионное масло | 0,1 мл | 400 мл |
| Ксилол | 1 мл | 400 мл |
| Глицерин | | |
| Дезинфектанты (5% хлорамин, или 5% фенол, или 5% гипохлорид натрия) | – | 20 л |

Вопросы

1. Перечислите основное оборудование и расходные материалы, необходимые для проведения исследования мазка по Цилю–Нильсену.
2. Перечислите необходимые предметы, которые должны находиться на столе, где готовятся мазки. Перечислите предметы и реактивы, которые понадобятся Вам при проведении процедуры окрашивания мазков по Цилю–Нильсену.

2.3.2. Микроскоп

Устройство микроскопа

Механическая часть микроскопа



Рис. 10

Штатив микроскопа (рис. 10) представляет собой конструкцию, обеспечивающую устойчивость всего прибора, и в частности предметного столика, на котором устанавливаются предметные стекла с мазками. Предметные стекла закрепляются зажимами, расположенными на предметном столике, или с помощью препаратоводителя. При координатном перемещении предметного столика осуществляется движение предметного стекла вдоль и перпендикулярно просматриваемому полю, что обеспечивает смену поля видения.

На штативе микроскопа находится визуальная насадка для установки окуляров и револьверное устройство для крепления объективов. Визуальная насадка является сменным узлом и может быть как монокулярной (для установки одного окуляра и наблюдения од-

ним глазом), так и бинокулярной (для двух окуляров). Кроме того, насадки могут иметь дополнительный выход для установки фото/видеосистем.

Бинокулярная насадка (рис. 11) обеспечивает установку индивидуальной глазной базы микроскописта, а также корректировку остроты зрения глаз. Корректировка осуществляется за счет вращения подвижного компонента на окуляре или окулярной трубке.



Рис. 11

Оптическая система микроскопа

В микроскопе изображение создается за счет светового потока, прошедшего через предметное стекло с мазком.

Микроскоп состоит из осветителя, объектива и окуляра.

Свет, проходя через объект, расположенный в плоскости предмета (предметный стол), попадает в объектив, который создает увеличенное изображение в плоскости изображения, далее с помощью окуляра это изображение с дополнительным увеличением передается на сетчатку глаза наблюдателя.

Световой поток создается с помощью осветительного зеркала или встроенного осветителя с источником света.

Зеркало имеет две поверхности: плоскую и вогнутую. Зеркальная поверхность собирает и направляет лучи от источника света в плоскость предмета, т.е. на мазок, расположенный на предметном стекле и установленный на предметном столе микроскопа. Вогнутая поверхность зеркала используется в тех случаях, когда источник света мал или требуется освещение больших полей.

Зеркальная осветительная система позволяет использовать естественный или удаленный (настольная лампа, автономный осветитель ОИ 19 и т. д.) источник освещения.

В современных микроскопах источник света встраивается в основание микроскопа (рис. 12). Фиксированный источник света находится на постоянном расстоянии.

В качестве источника света используются галогенные лампы или лампы накаливания разной мощности.

Осветительная система, кроме источника света, включает в себя отдельный узел – **конденсор**. Конденсор представляет собой систему линз, обеспечивающую такой световой конус (рис. 13), который, проходя через мазок, собирает свет на мазке. В конденсоре установлена регулируемая диафрагма, расширяющая осветительный угол (апертурная диафрагма).

Конденсор должен быть отцентрирован относительно оптической оси микроскопа и источника света. Центрировка осуществляется с помощью двух центриро-



Рис. 12

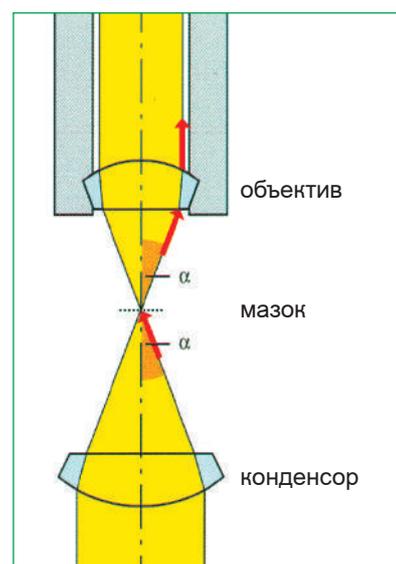


Рис. 13

вочных винтов, расположенных в узле крепления конденсора, который, кроме того, имеет еще и вертикальное (фокусирующее) перемещение.

Центрировка осветительной системы (принцип Келера) осуществляется следующим образом (рис. 14):

- установить с помощью револьверного устройства в рабочее положение объектив с самым малым увеличением;
- получить резкое изображение мазка с помощью фокусирующего механизма микроскопа (рис. 14, 1-1);
- прикрыть полевую диафрагму, расположенную на штативе микроскопа (вблизи источника света, см. рис. 12);
- получить резкое изображение полевой диафрагмы с помощью перемещения конденсора вверх (рис. 14, 1-2);
- установить полевую диафрагму в центр поля зрения с помощью центрировочных винтов конденсора движением «один винт ввинчивается, другой – отвинчивается» (рис. 14, 2-1);
- раскрыть полевую диафрагму по полю зрения (рис. 14, 2-2).

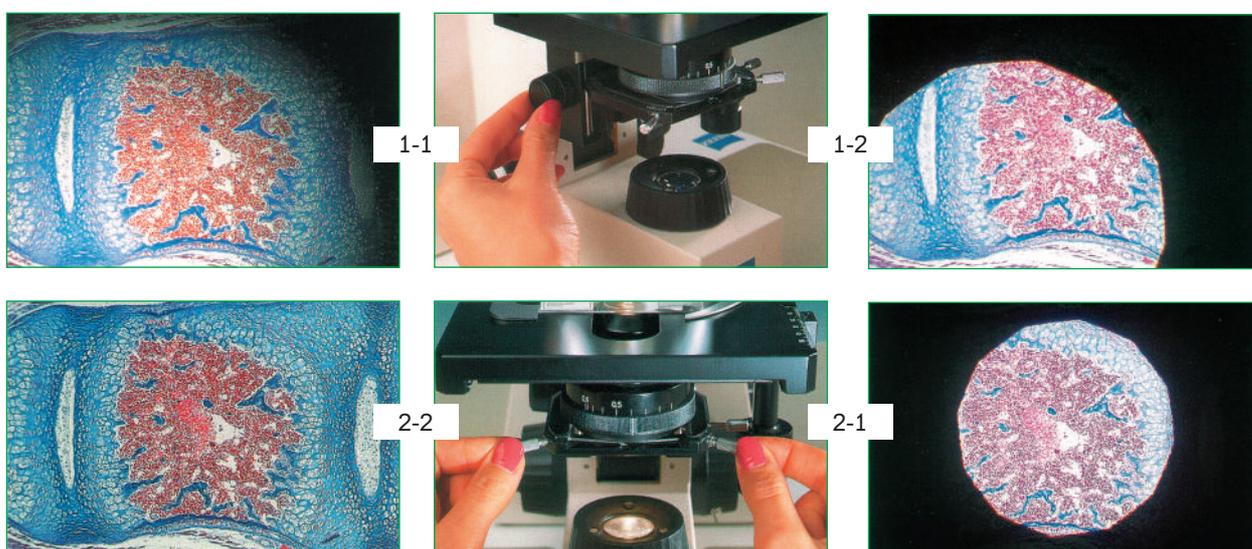


Рис. 14 Настройка освещения по Келеру:

1-1 – нерезкое изображение полевой диафрагмы;

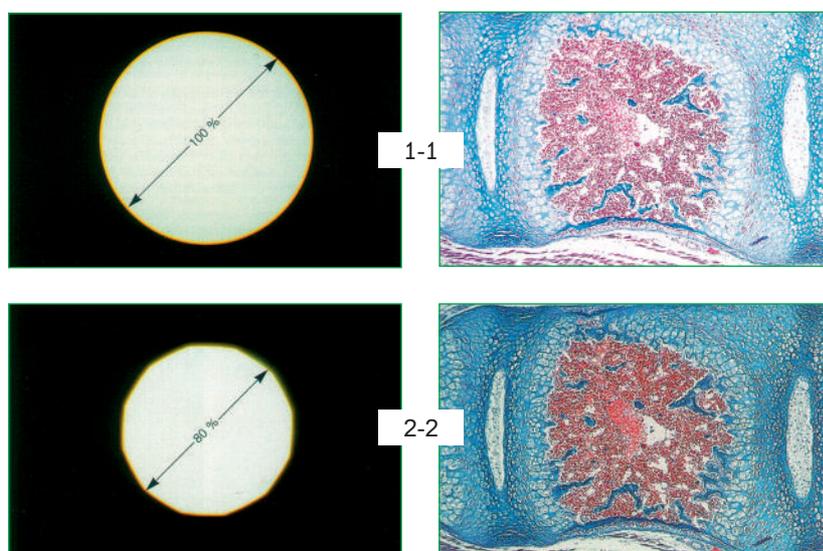
1-2 – движением конденсора вверх получается резкое изображение полевой диафрагмы;

2-1 – с помощью центрировочных винтов конденсора полевая диафрагма устанавливается в центре поля зрения;

2-2 – полевая диафрагма открывается по полю зрения.

Для удобства выполнения манипуляций по центрировке конденсора рекомендуется найти прозрачное место на препарате.

С другой стороны, при отсутствии полевой диафрагмы, рекомендуется центрировку производить по узкому пучку света, полученному в результате прохождения света через закрытую апертурную диафрагму конденсора. При этом препаратом может служить матовый светофильтр, который следует установить на предметный столик матовой стороной вверх, затем закрыть диафрагму, отрегулировать для объектива с малым увеличением резкость изображения узкого пучка света, а затем с помощью центрировочных винтов поместить его в центр. По окончании настройки освещения следует открыть апертурную диафрагму примерно на 1/3, предварительно вынув окуляр (рис. 15), а также отрегулировать интенсивность освещения.



Вынуть окуляр и открыть апертурную диафрагму полностью (1-1) или на 1/3 (2-2) **Рис. 15**

Объективы. Как правило, объективы классифицируются в зависимости от:

- типа оптической коррекции (ахроматы, планахроматы, апохроматы, планапохроматы);
- увеличения (малое – до $\times 20$; среднее – до $\times 50$; большое – до $\times 100$);
- числовой апертуры (малая – до 0,20; средняя – до 0,65; большая – до 1,30).

Разрешающая способность в микроскопе определяется числовой апертурой и длиной волны.

Апертура сообщает о свойствах линз объектива. До определенного предела увеличение апертуры линз объектива увеличивает его разрешающую способность.

Прохождение света через оптическую систему изогнутых линз приводит к его разложению на спектр волн различной длины. Это приводит к появлению цветных полос на периферической части линзы, так называемых цветных aberrаций. Чем больше увеличение, тем большая aberrация будет иметь место. Различные цвета (то есть световые волны различной длины) не фокусируются в одном месте, что приводит к появлению сферической aberrации. Подобные эффекты компенсируются применением системы комбинированных линз.

Ахроматические объективы представляют собой оптические системы, скорректированные (исправленные) для одной основной длины волны (зеленый цвет – линия «e») за счет применения соответствующих марок стекол и их сочетания, так называемых «ахроматических пар». При расчете корректируются такие aberrации, как сферическая, астигматизм, кома.

Апохроматические объективы представляют собой оптические системы, скорректированные (исправленные) для трех основных длин волн (зеленой, красной и синей). Исправления осуществляются за счет применения соответствующих марок стекол и кристаллов, а также их сочетаний, так называемых апохроматических пар. Часто в состав таких объективов входит флюорит. В таком случае это отмечается в названии объективов. Обычно они отличаются от ахроматических систем своими параметрами, в частности повышенными значениями числовых апертур.

Апохроматические и флюоритовые объективы обладают высоким разрешением и контрастом.

Ахроматические и апохроматические объективы исправлены для центральной части поля.

Все типы объективов могут быть исправлены по полю, так называемые план-объективы. Это выносится в название объектива – план-ахроматы, план-апохроматы, план-неофлюары.

Иммерсионные объективы. Фронтальная (передняя) поверхность линзы обычных объективов (неиммерсионных или сухих) не предназначена для контакта с какой-либо иной средой, кроме воздуха (показатель преломления воздуха $n = 1$). Показатель преломления стекла, используемого для изготовления предметных стекол, равен $n = 1,51$. При прохождении света через стекло лучи преломляются на границе двух сред «стекло – воздух»; часть лучей не падает в объектив (рис. 16).

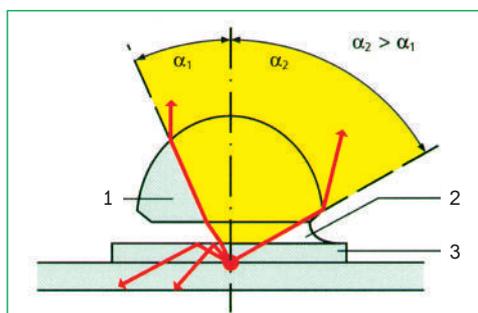


Рис. 16 Сухие и иммерсионные системы объектива:
1 – объектив;
2 – иммерсия;
3 – покровное стекло;
 α – апертурный угол

В иммерсионной системе масло (вода, глицерин) используется для того, чтобы заполнить промежуток между фронтальной линзой объектива (или конденсора) и поверхностью предметного (покровного) стекла и таким образом увеличить световой поток (числовую апертуру оптической системы).

Например, объектив $\times 100/1,25$ при отсутствии иммерсии имеет числовую апертуру до 1, с применением иммерсионного масла – 1,25. То же относится к конденсору. Применение иммерсии приводит к увеличению разрешающей способности микроскопа.

Все указанные параметры – увеличение, числовая апертура, иммерсия – маркируются на корпусе объектива.

Окуляр представляет собой систему линз, обеспечивающую проекцию изображения, созданного объективом, на сетчатку глаза микроскописта. Окуляр, работая как лупа, обеспечивает дополнительное увеличение.

Нижняя линза, вмонтированная в тубус окуляра, называется собирающей – она выравнивает и придает ясность реальному изображению и, таким образом, завершает работу объектива. Верхняя линза, вмонтированная в тубус окуляра, увеличивает изображение и создает фактический образ увеличенного объекта.

Окуляр устанавливается в окулярную трубку визуальной насадки. Увеличение окуляра – не более $\times 20$. Кроме увеличения, основной характеристикой окуляра является линейное поле. Оба параметра маркируются на корпусе окуляра.

Подготовка микроскопа к работе

- Проверить микроскоп на наличие поврежденных или сломанных частей.
- Убедиться в том, что все компоненты оптической системы (линзы, зеркала, светопроводящие поверхности) чисты.
- Проверить положение конденсора – он должен находиться в верхнем положении с открытой апертурной диафрагмой.
- Скорректировать свет с помощью зеркала (при его наличии), конденсора и диафрагм таким образом, чтобы четкий пучок света был направлен в объектив (настройка освещения по Келеру).

- Проверить работу фокусировочного механизма грубой настройки (макровинт), опуская предметный столик и отдаляя таким образом его от объектива.
- Повернуть револьверное устройство с объективами таким образом, чтобы объектив с малым увеличением ($\times 5$ или $\times 10$) оказался в рабочем положении (над конденсором).
- Поместить стекло с мазком на предметный столик непосредственно под объектив, закрепить его с помощью клемм (или зажимного устройства) препаратоводителя.
- С помощью рукояток препаратоводителя или предметного координатного столика следует выбрать участок на препарате для начала просмотра – для светового микроскопа это может быть наиболее интенсивно окрашенный участок препарата.
- Установить глазную базу бинокулярной насадки с помощью разведения окулярных трубок и движением головы добиться совмещения выходного зрачка микроскопа с входным зрачком глаза таким образом, чтобы оба глаза наблюдателя видели одно равномерно освещенное поле на предмете.
- Глядя сбоку от предметного столика, необходимо контролировать расстояние, остающееся между препаратом и фронтальной линзой объектива. Вращая рукоятку грубой фокусировки, следует приблизить предметный столик с препаратом к объективу как можно ближе, но не касаясь его поверхности. *Не допускать соприкосновения предметного стекла с фронтальной линзой объектива!*
- Наблюдая через окуляры и медленно вращая рукоятку грубой фокусировки, осуществить движение предметного столика с препаратом вниз от линзы объектива до получения резкого изображения мазка.
- С помощью рукоятки точной фокусировки (микровинта) добиться наиболее четкого изображения мазка.
- Настроить освещение таким образом, чтобы было достаточно ярко, но в то же время не слепило глаза и не вызывало дискомфорта. Настройку можно осуществлять как с помощью изменения интенсивности накала лампы, так и регулировкой апертурной диафрагмы конденсора или использованием нейтральных светофильтров. Как правило, изменение светового конуса (осветительной апертуры) с помощью изменения диаметра апертурной диафрагмы – вполне достаточное средство для изменения интенсивности освещенности.
- Установить на окулярной трубке с диоптрийной наводкой (или на окуляре с диоптрийной наводкой) «0» относительно неподвижной риски (рис. 17). Глядя правым глазом в правый окуляр, с помощью механизма точной фокусировки добиться резкого изображения мазка для правого глаза. Наблюдая левым глазом в левый окуляр, с помощью подвижного диоптрийного механизма на окулярной трубке (или подвижного оптического элемента окуляра) получить резкое изображение мазка для левого глаза.
- **При использовании иммерсионной системы** следует поворотом револьверного устройства сместить сухой объектив так, чтобы стал свободным доступ к препарату. Необходимо капнуть иммерсионное масло на мазок, не касаясь поверхности предметного стекла пипет-



Настройка бинокулярной насадки **Рис. 17**

кой или палочкой, дать маслу свободно стечь. **Пипетка или капельница масла ни в коем случае не должна соприкоснуться с мазком!**

- Контролируя со стороны, следует повернуть револьверное устройство с объективами и установить в рабочее положение (непосредственно над мазком) иммерсионный объектив ($\times 90-100$). Убедиться, что фронтальная линза объектива не касается предметного стекла.
- Глядя сбоку, медленно вращать рукоятку грубой фокусировки, приближая препарат к объективу до соприкосновения иммерсионного объектива с маслом; затем слегка погрузить объектив в масло (до появления эффекта втягивания капли). **Никогда не допускайте соприкосновения линзы объектива с предметным стеклом – это может повредить фронтальную линзу объектива или разбить препарат!**
- Мазок должен почти идеально совпадать с фокусом объектива. Настройку на резкость следует производить с помощью винтов грубой и точной регулировки (лучшее наведение достигается при помощи микровинта). Глядя в окуляры, медленно опускайте предметный столик микроскопа с помощью макровинта до появления образа, для подфокусировки следует воспользоваться рукояткой точной фокусировки и добиться резкого изображения мазка. При смене объектива целесообразно провести поднастройку света.

Уход за микроскопом

Микроскоп требует тщательного ухода и осторожного обращения. Лабораторные работники должны быть знакомы с устройством механических и оптических частей микроскопа. Подробное знание устройства необязательно для соблюдения основных принципов при работе и уходе за микроскопом. Ремонт и профилактический осмотр микроскопа должен проводиться только профессионалами. В комплекте с микроскопами большинство производителей поставляют руководство, содержащее полезную информацию и инструкции по устранению простейших неполадок.

Необходимо соблюдать следующие правила ухода за микроскопом.

- Если микроскоп не используется, его следует хранить в оригинальной упаковке, либо защищенным от пыли пластиковым чехлом.
- Следует избегать высокой влажности в помещении микроскопной. Влажность способствует развитию плесени на линзах объектива и окуляров и является причиной порчи металлических частей микроскопа. В целях снижения влажности рекомендуется помещать неглубокую посуду с сухим голубым силикагелем в упаковку с микроскопом, где бы и какое бы длительное время он ни хранился. По мере того как силикагель набирает влагу и становится неспособным ее абсорбировать, он меняет цвет с синего на розовый. В подобных случаях рекомендуется заменить силикагель либо прогреть отсыревший силикагель в сухожаровом шкафу до появления оригинального голубого окрашивания.
- Для устранения небольшого налета плесени рекомендуется слегка смочить кусочки мягкой ткани или ватный тампон соответствующим раствором противогрибкового препарата и, прилагая умеренные усилия, протереть линзы круговыми движениями (рис. 18). При необходимости следует повторить процедуру со свежим слегка увлажненным тампоном, после чего линзы объектива и окуляра протираются специальной салфеткой для линз.

- Следует размещать микроскопы вдали от окисляющих реагентов, емкостей с водой и прочими корродирующими агентами.
- Микроскоп следует поднимать двумя руками, одной рукой держа сам микроскоп за штатив с фокусирующим механизмом, а другой рукой поддерживая основание микроскопа. Никогда не переносите микроскоп одной рукой.
- Устанавливайте микроскоп на ровной и устойчивой поверхности. Не размещайте на одном столе с микроскопом оборудование, создающее вибрацию, например центрифугу.
- При ежедневном использовании не следует перемещать микроскоп с места установки.
- Обязательно накрывайте микроскоп пластиковым чехлом после работы.
- Необходимо оберегать микроскоп от механических ударов.
- Для продления срока службы ламп в осветителях рекомендуется не подвергать их резким перепадам напряжения и перед включением и выключением переводить регулятор накала нити лампы (реостат) в минимальное положение. Осветители без регулятора накала (реостата) для продления срока службы лампы рекомендуется реже выключать.
- Нельзя без необходимости снимать бинокулярную насадку и касаться пальцами поверхности тубусной линзы.
- Категорически запрещается снимать «рубашку» (металлический корпус) объектива и заниматься его разборкой.
- Каждый объектив должен быть ввинчен до конца в гнездо револьверного устройства и четко фиксироваться в ходе лучей в рабочем состоянии микроскопа.
- Во внерабочем состоянии микроскопа объективы должны быть опущены (причем в ход лучей должен быть установлен объектив малого увеличения). При этом объектив не должен касаться предметного столика.
- Для предохранения попадания пыли внутрь микроскопа (если отсутствует чехол) окуляры должны быть вставлены в окулярные трубки, объективы ввинчены в гнезда револьверного устройства. Если отсутствуют окуляры, то на окулярные трубки необходимо сделать бумажный чехол, а там, где нет объективов, в гнездо вставить заглушку или заклеить широким скотчем.
- Необходимо предохранять фронтальные линзы объективов и конденсора, а также глазные линзы окуляров от соприкосновения с различными реактивами.
- Нельзя касаться любой стеклянной поверхности пальцами, так как на поверхности остаются жирные следы. После этого требуется проводить внеплановую чистку оптики, которая может повлечь за собой повреждение просветляющих поверхностей.
- Рекомендуется перед началом или в конце работы оценить чистоту основных оптических поверхностей объектива, окуляров и конденсора микроскопа и в случае загрязнения немедленно подвергнуть их чистке.
- Можно легко поцарапать линзы объектива, окуляра, конденсора грязью или песком и прочими твердыми частицами. Не следует использовать для протирки линз жесткие тряпки или марлю, поскольку они могут поцарапать оптику. Никогда не используйте мыло для чистки оптики. Рекомендуется протирать оптику только чистой и сухой салфеткой для линз.

- При необходимости для очистки линз объектива от масла следует использовать специальные влажные салфетки для линз или мягкую фланелевую ткань, *слегка* смоченную в соответствующей жидкости, рекомендованной фирмой – изготовителем микроскопа. Обычно для этих целей рекомендуется использовать ксилол (ксилен). Однако могут быть использованы и другие жидкости, если это оговорено в инструкции по эксплуатации микроскопа. Например, для очистки линз объектива от масла может быть использована спиртоэфирная смесь (8 объемов эфира + 2 объема спирта) либо 96° этиловый спирт (если это разрешено фирмой – изготовителем микроскопа).
- Нельзя допускать, чтобы иммерсионное масло попадало на предметный столик (платформа, на которую помещают мазки при микроскопировании). После микроскопирования каждого мазка следует протирать оптику объектива чистой салфеткой для линз во избежание перекрестного переноса кислотоустойчивых бактерий.
- Иммерсионное масло не должно попадать на объективы, не предусмотренные для работы с ним. В случае если масло попало на оптику объектива, не предназначенного для работы с маслом, необходимо немедленно его удалить.
- Никогда не разбирайте микроскоп, в случае неполадок необходимо обратиться в сервисную службу.

Ежедневный уход

- По окончании работы иммерсионный объектив необходимо протереть от масла специальной увлажненной салфеткой для линз или мягкой фланелевой тканью, *слегка* смоченной в соответствующей жидкости, в качестве которой обычно используют ксилол, но может быть использована спиртоэфирная смесь либо 96° этиловый спирт (в том случае, если это рекомендовано фирмой – изготовителем микроскопа). Конденсор и предметный столик обрабатываются бумажной салфеткой для линз, также *слегка* смоченной в ксилоле, спиртоэфирной смеси или спирте.
- Отключить источник света от питания. Перед выключением установить регулятор интенсивности освещения на минимальный уровень.
- Накрыть микроскоп чехлом.

Ежемесячный уход

- Пропылесосить микроскоп (простейший пылесос можно сделать из Пастеровской пипетки и резиновой груши). Протереть объективы и конденсор салфетками для линз, *слегка* смоченными в соответствующей жидкости: ксилоле, спиртоэфирной смеси или спирте (согласно инструкции по эксплуатации микроскопа). Окулярные микроскопа протирают специальной антистатической тканью, мягкой кистью или чистят струей сухого воздуха от небольшой груши – нельзя использовать для чистки окуляров растворители (в исключительных случаях окуляры можно протереть тканью, *слегка* смоченной в 96° этиловом спирте).
- Снять препаратопроводитель или клеммы для предметных стекол с предметного стола и протереть его.
- Корпус микроскопа и выходное окно осветителя протереть от пыли бумажной салфеткой, *слегка* смоченной в спирте.

Каждые полгода представители сервисной технической службы должны проводить профилактическую чистку и смазку микроскопа.

Чистка объектива

Если иммерсионное мало соответствует стандарту, то его вязкость такова, что позволяет производить чистку фронтального компонента с помощью бумажной салфетки или фланелевой тряпочки. Однако если иммерсионная жидкость старая и загустела, если слой иммерсии застыл (так как объектив давно не чистили), то объектив необходимо вывернуть и подвергнуть тщательной чистке. То же относится к сухим объективам, опущенным в слой иммерсии.

Процесс чистки следующий (рис. 18).

- Вывернуть объектив из микроскопа (или установить объектив в положение, удобное для чистки с большим свободным расстоянием).

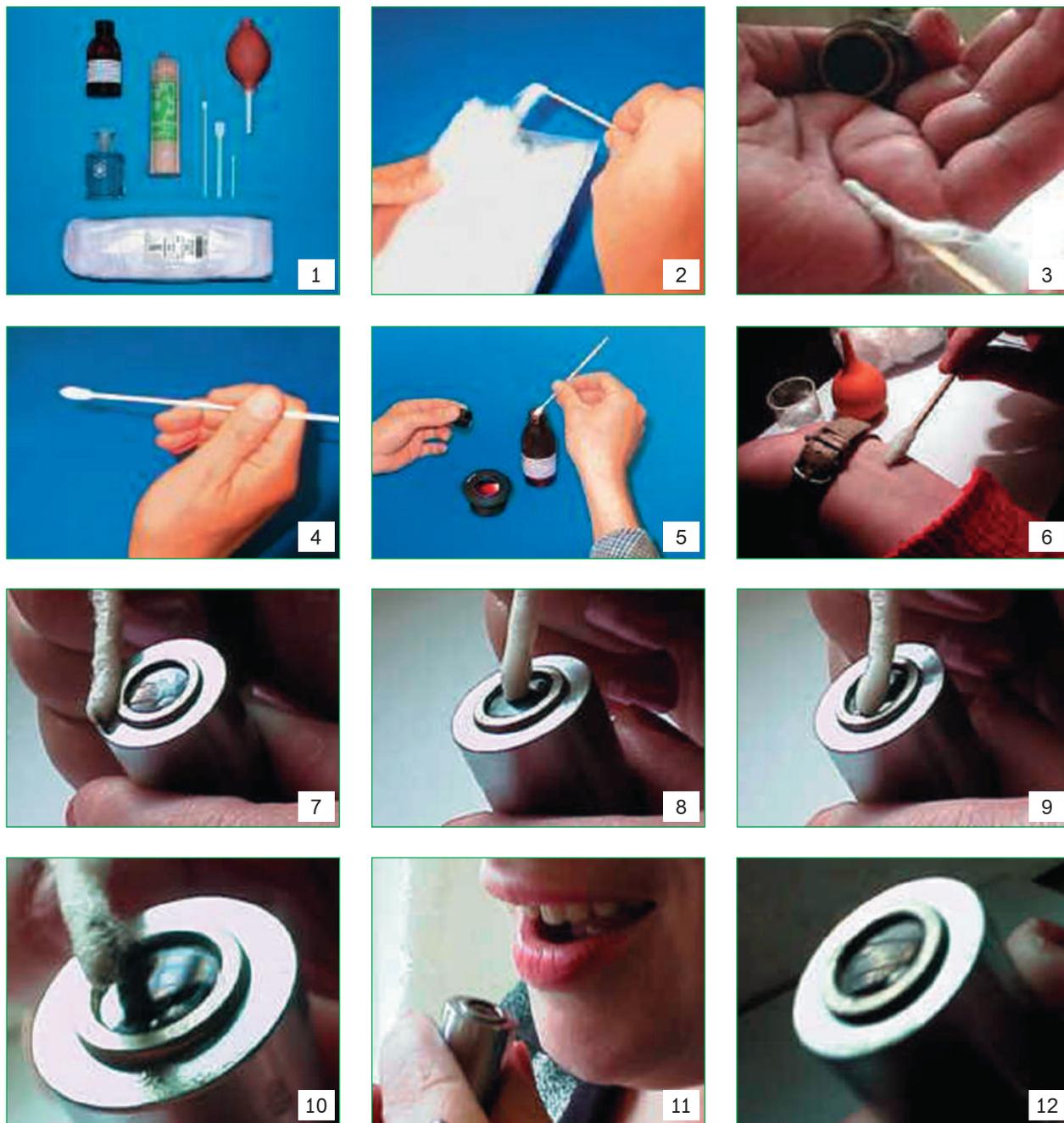


Рис. 18
Процесс «активной» чистки оптики: 1 – набор микроскописта для чистки оптики; 2, 3, 4 – получение ватного тампона; 5, 6 – слегка смочить ватный тампон и проверить; 7, 8, 9, 10 – сначала снять слой масла, затем тампоном – круговым движением от центра линзы к краю и вывести через оправу; 11 – дышать; 12 – после повторной протирки сухим тампоном проверить чистоту поверхности

- Сделать тампон из ваты:
 - слегка смочить заостренный кончик палочки в спирте;
 - из большого количества ваты, наматывая на кончик палочки, вытянуть небольшой кусочек ваты;
 - положить палочку с ватой на ладонь и скатать вату в тампон.
- Сухим тампоном одним движением руки снять иммерсию с первой линзы объектива, убрать грязный тампон.
- Сделать тампон из ваты.
- Смочить тампон в смеси следующим образом:
 - осторожно обмакнуть тампон во флакон со смесью, едва погружая палочку;
 - вынуть палочку с тампоном и промокнуть на сгибе руки около ладони; лишняя влага не должна попасть на фронтальную часть объектива, так как в противном случае линза объектива может выпасть из оправы.
- Кругообразным движением, без вдавливания линзы внутрь объектива, аккуратно протереть поверхность линзы и металлическую оправу.
- Сделать следующий тампон.
- Подышать на поверхность.
- Протереть стеклянную поверхность палочкой с сухим тампоном.
- Проверить чистоту поверхности, наклонив объектив. В противном случае операцию придется повторить.

Задание 1

Настройте микроскоп и найдите поле зрения на мазке

2.3.3. Весы

Весы являются весьма точным и хрупким инструментом, требующим осторожного обращения.

Всегда следуйте инструкциям, как правило, подробно изложенным в руководстве по эксплуатации.

- Всегда содержите весы в чистоте, вдали от коррозирующих реактивов и высокой влажности. Любые повреждения поверхности весов повлекут за собой отклонения в точности измерений.
- Не следует взвешивать материалы непосредственно на чашках весов, всегда используется контейнер или соответствующая бумага для взвешивания. Вычитайте вес контейнера или бумаги из общего результата.
- Защищайте весы от сквозняков. Движения воздуха вокруг весов могут быть причиной неточного результата при взвешивании. Как правило, точные весы имеют защитные колпаки, которые рекомендуется использовать при взвешивании.
- Не возвращайте неиспользованные субстанции обратно во флаконы, где они хранились (во избежание контаминации всего флакона).

1. Расскажите об устройстве светового бинокулярного микроскопа и охарактеризуйте его составные части.
2. Перечислите последовательность действий по подготовке микроскопа к работе, в том числе порядок настройки микроскопа по Келеру.
3. Расскажите, как Вы будете ухаживать за микроскопом в процессе его эксплуатации.
4. Опишите способ очистки линз объектива от масла, используемый при ежедневной работе, а также процесс тщательной чистки объектива.

2.4. Планирование работы лаборатории. Расчет потребностей центра микроскопии в расходных материалах и реактивах

Расчет нагрузки лаборатории и стоимости выявления одного бациллярного больного

Расчет стоимости выявления одного бациллярного больного туберкулезом легких представлен на схеме 1.

Схема 1

Стоимость выявления одного бациллярного больного туберкулезом легких методом световой микроскопии мокроты по Цилю–Нильсену в регионе N

| | | |
|---|----------------|---------|
| Население региона | 1 000 000 чел. | |
| Заболеваемость | 100/100 000 | |
| Число новых случаев в год | 1 000 | |
| Число больных с положительным мазком (50%) | 500 | |
| Предполагаемая доля больных с положительным мазком среди всех обследованных | 0,5% | 5% |
| Необходимое число обследованных пациентов для выявления 1 больного | 200 | 20 |
| Необходимое число обследованных для выявления всех бациллярных по мазку больных | 100 000 | 10 000 |
| Число мазков | 300 000 | 30 000 |
| Стоимость исследований при цене за 1 мазок в 50,00 руб. | 1 500 000 | 150 000 |

На указанной схеме приведены два варианта расчета стоимости выявления бациллярного больного туберкулезом в зависимости от эффективности микроскопии. Данная схема наглядно иллюстрирует то обстоятельство, что при низкой эффективности микроскопии затраты на выявление 1 бациллярного больного значительно возрастают (сравните: при эффективности 5% для выявления 1 больного обследуются 20 подозреваемых на туберкулезную инфекцию, при эффективности 0,5% – 200).

Отметим, что эффективность работы лаборатории зависит не только от качества работы самой лаборатории, но и от правильной организации микроскопических исследований методом Циля–Нильсена, в частности от того, насколько обоснованно отобраны пациенты для обследования их методом микроскопии, от качества собранного диагностического материала и от соблюдения кратности обследования.

Расчет нагрузки на лабораторию (количество исследований, которые должна выполнить лаборатория, исходя из количества пациентов, которых необходимо обследовать методом микроскопии), представлен на схеме 2.

Расчеты нагрузки следует производить, исходя из того, какие виды работ выполняет данная лаборатория – только исследования с целью диагностики туберкулеза либо исследования, проводимые как с целью диагностики, так и для контроля химиотерапии больных туберкулезом.

Схема 2

Расчет количества микроскопических исследований методом Циля–Нильсена

Заболеваемость – 100/100 000

Процент положительных результатов (пациентов с положительным мазком) – 5%,
или 1 на 20 обследованных



В год должны быть обследованы 2000 пациентов для диагностики
 2000×3 мазка = 6000 мазков в год

+ 6 мазков на контроль химиотерапии

100×6 мазков = 600

+ 20% неудач лечения/хроников

$20 \times 3 = 60$

+ контроль химиотерапии повторного лечения или хроников

$20 \times 8 = 160$

+ контроль химиотерапии первоначально отрицательных по мазку случаев – ~20% от всех

$20 \times 2 = 40$

Итого: 6860 мазков

6860 мазков/250 рабочих дней = средняя нагрузка 27–28 мазков в день

Расчет необходимого запаса реактивов

Расход материалов на 1 мазок представлен в табл. 2. При расчете заказа сухих реактивов на 6 месяцев исходят из количества зарегистрированных в обслуживаемом районе больных, выявляемости бациллярных больных в данной лаборатории и необходимости двукратного запаса, уменьшенного на остаток реактивов на складе.

Пример. В районе, обслуживаемом лабораторией А, в текущем полугодии зарегистрировано 120 пациентов. Выявляемость составила 5%. На следующие 6 месяцев лаборатория должна заказать основной фуксин в количестве, достаточном для приготовления 7200 мазков (120 пациентов $\times 3$ мазка $\times 100\%/5\%$ выявляемости), т. е. $0,015$ г основного фуксина $\times 7200 = 108$ г. Однако на складе еще хранится 25 г основного фуксина. Значит, лаборатория должна заказать 108 г – 25 г = 83 г основного фуксина, или 1 упаковку по 100 г.

В лабораториях, которые получают готовые реактивы из вышестоящей лаборатории, запас раствора карболового фуксина не должен превышать месячной потребности.

ВНИМАНИЕ!

При расчете необходимого количества растворов считают, что на окраску 1 мазка расходуется по 5 мл каждого из растворов (карболового фуксина, 0,3% метиленового синего, 25% серной кислоты или 3% солянокислого спирта).

Пример. Ежемесячная нагрузка лаборатории А составляет 120 мазков. Объем раствора карболового фуксина, необходимый лаборатории на 1 месяц, – 600 мл. Таким образом, если в лаборатории 15 марта имеется 500 мл карболового фуксина с датой приготовления 1 марта этого же года, избыток реактива составляет 200 мл. Если в лаборатории осталось 100 мл реагента, ей не хватит красителя до конца месяца при сохранении такой же нагрузки.

Задача 1

В текущем полугодии в обслуживаемом лабораторией районе зарегистрировано 35 больных туберкулезом с положительным мазком. Выявляемость составила 1%. Какое количество основного фуксина, метиленового синего, серной кислоты, фенола и предметных стекол необходимо заказать на следующее полугодие?

Задача 2

В текущем полугодии в обслуживаемом лабораторией районе зарегистрировано 120 больных туберкулезом с положительным мазком. Выявляемость составила 2%. На складе осталось 100 г основного фуксина, 50 г метиленового синего, 500 предметных стекол. Какое количество основного фуксина, метиленового синего, серной кислоты, фенола и предметных стекол необходимо заказать на следующее полугодие?

Задача 3

Какое количество растворов красителей необходимо поставлять в лабораторию, если ежемесячная нагрузка составляет 123 мазка?

3 Методика прямой микроскопии мазка, окрашенного методом Циля–Нильсена

3.1. Диагностический материал

Мокрота

Несмотря на то что МБТ могут поражать практически любой орган (туберкулезной инфекцией не поражаются только волосы и ногти), более 85% случаев туберкулеза в странах с высоким уровнем заболеваемости приходится на легочную форму. Даже в случае подозрения на внелегочный туберкулез рекомендуется дополнительно исследовать мокроту (при ее наличии).

Хорошо собранный материал содержит отделяемое бронхиального дерева и минимум секрета из носовой и ротовой полостей и представляет собой слизистое или слизисто-гнойное отделяемое. Качество собранного материала гораздо важнее его количества. Достаточный объем образца мокроты для исследования составляет 3–5 мл, хотя и меньшее количество может оказаться достаточным при удовлетворительном качестве.

Другие (внелегочные) материалы для исследования

Поскольку микобактерии туберкулеза могут инфицировать практически любой орган, в лабораторию может поступать различный материал внелегочной локализации, например внутриполостные жидкости (асцитическая, плевральная, суставная), ткани, гной и моча. Возможности микроскопического метода исследования здесь ограничены, и поэтому рекомендуется материал внелегочной локализации исследовать культуральным методом.

Промывные воды желудка. Прямой микроскопии промывных вод следует избегать, поскольку кислотоустойчивые бактерии часто присутствуют в пище и воде, а следовательно, и в желудке. Практически невозможно дифференцировать подобные микроорганизмы при микроскопии, и при положительном результате бактериоскопии по Цилю–Нильсену следует провести дополнительные диагностические тесты.

Смывы с задней стенки глотки. Прямая микроскопия подобного материала практически бесполезна. Отрицательный результат в подобном случае недостаточно информативен, рекомендуется провести культуральные исследования материала.

Моча. Мазки, сделанные из полученного центрифугированием осадка, ненадежны, и их приготовления следует избегать, так как иногда в моче присутствуют нетуберкулезные микобактерии. При наличии кислотоустойчивых палочковидных форм МБ в моче следует провести дополнительные исследования.

3.2. Прием и регистрация поступившего материала

Прием анализов должен проводиться в специально отведенном месте. Ящики с контейнерами должны открываться в вытяжном шкафу, шкафу биологической безопасности или на специально выделенном столе с соблюдением следующих требований.

- Надеть одноразовые перчатки.
- Произвести внешний осмотр ящика. Проверить, не вылилась ли мокрота. В случае если обнаруживается загрязнение ящика, автоклавируйте весь ящик или сожгите его.
- Провести наружную обработку ящика соответствующим дезинфектантом.
- Осторожно открыть ящик и проверить целостность контейнеров. Битые контейнеры помещаются в дезинфектант, кипятятся или автоклавируются. Мазки из такого образца не готовятся. В этом случае необходимо запросить новый анализ.
- Извлечь контейнеры из ящика.
- Проверить соответствие номеров в сопроводительном списке и направлениях номеров, обозначенным на контейнерах.
- Продезинфицировать внутреннюю часть ящика, снять перчатки и поместить их в контейнер для дезинфекции, а затем вымыть руки с мылом.

Далее присвойте каждому образцу мокроты лабораторный номер.

В случае если это первый образец от данного больного, присвойте ему первый свободный номер по журналу 04-ТБ/у (см. образец журнала в разделе 3.7.3).

В случае если поступивший образец является второй или третьей порцией, присвойте ему номер первой порции мокроты, поступившей от этого больного, и соответствующий номеру порции индекс (например, 121/2 или 121/3).

Пометьте соответствующим номером контейнер (**на боковой стенке**) и внесите номер в бланк ответа 05-ТБ/у (см. образец бланка в разделе 3.7.3).

ВНИМАНИЕ!

Будьте внимательны при присвоении номера и маркировке контейнера. Ошибки на этом этапе приведут к ложноположительным или ложноотрицательным результатам.

Оценка объема и качества поступающего материала.

Удовлетворительное качество материала подразумевает наличие в материале слизистой или слизисто-гноющей мокроты. Объем собранного материала должен быть в пределах 3–5 мл, хотя при удовлетворительном качестве приемлемо и меньшее количество.

Отметьте качество поступившего материала в журнале 04-ТБ/у и в бланке 05-ТБ/у.

3.3. Приготовление препаратов из мокроты

3.3.1. Подготовка предметных стекол

Процедура приготовления мазков начинается с подготовки предметных стекол. Необходимо использовать только новые, отмытые и обезжиренные в спирте или смеси Никифорова (96° этиловый спирт + эфир в соотношении 1:1) стекла без царапин и сколов. При повторном использовании они могут быть недостаточно хорошо отмыты от предыдущего материала, что может привести к получению ложноположительных результатов.

Обработка новых предметных стекол

Новые предметные стекла кипятят в 1% растворе пищевой соды (10 г двууглекислого натрия на 1 л воды), промывают в 1% растворе соляной кислоты (к 1 л воды добавляют 10 мл концентрированной соляной кислоты), а затем проточной водой. 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 24–48 часов. Непосредственно перед приготовлением мазка стекла повторно протираются насухо.

Возможно обезжиривание новых стекол путем прожигания их в горячей части пламени горелки.

3.3.2. Способ приготовления мазков из нативной мокроты

Перед началом приготовления мазков необходимо подготовить рабочее место, предназначенное для проведения этой процедуры (рис. 19). Приготовление мазков рекомендуется проводить в вытяжном шкафу или в биологическом шкафу безопасности (при наличии такового).



Рис. 19 Организация рабочего места для приготовления мазков из нативной мокроты

Мазки следует готовить в количестве, с которым удобно и безопасно работать (максимум до 12 мазков). Маркировка стекол должна осуществляться алмазным маркером или обычным восковым карандашом. Следует избегать касания пальцами поверхности предметных стекол.

Наибольшая вероятность найти кислотоустойчивые микобактерии в неконцентрированном материале представляется при исследовании плотных и твердых комочков в мокроте, и результат прямого микроскопического исследования в большой степени зависит от выбора именно этих комочков.

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 только в этом случае создаются условия для выбора частиц для приготовления мазка непосредственно из контейнера.

Методика приготовления мазка

- Промаркируйте чистое, непоцарапанное предметное стекло с одного края тем же номером, что и на контейнере с мокротой (лабораторный номер, присвоенный данному образцу).
- Выберите в мокроте комочки рядом с кровяными прожилками, непрозрачные, сероватого или желтоватого оттенка (рис. 21).
- Перенесите требуемое количество материала на предметное стекло, используя:
 - деревянные палочки-апликаторы (перед использованием палочку-апликатор разламывают пополам, см. рис. 20),
или
 - бактериологическую петлю (количества материала в 1 петле достаточно для приготовления 1 мазка).

Избегайте многократных заборов материала и отрывов петли или апликатора от мазка – при этих манипуляциях образуется аэрозоль!

- Выбранный из материала комочек равномерно распределите по предметному стеклу на площади примерно 2×1 см (рис. 22, 24); толщина мазка (рис. 25) должна позволять читать газетный текст, расположенный позади стекла на расстоянии 5–10 см (используйте сломанный конец деревянной палочки для равномерного распределения материала на стекле).

Не делать более одного мазка на предметное стекло!

- Сбросьте апликаторные палочки в раствор с дезинфектантом (рис. 23) и используйте новые для приготовления каждого мазка. При использовании петли ее освобождают от частиц мокроты, опуская несколько раз во флакон с песком и 70% спиртом или лизолом и после этого тщательно обжигают (цвет петли должен поменяться на красный). Песок для очистки петель может использоваться длительное время при условии периодического обновления раствора 70° спирта или лизола с таким расчетом, чтобы уровень жидкости превышал уровень песка не менее чем на 3 см. Пламя горелки или спиртовки должно быть бесцветным или голубым, поскольку оранжевое или красное пламя недостаточно горячее.
- Оставьте мазки на воздухе для высыхания.
Не использовать подогрев для подсушивания мазков!



Рис. 20 Подготовка аппликаторов к работе



Рис. 21 Выбор гнойных комочков из контейнера с мокротой



Распределение материала по предметному стеклу **Рис. 22**



Сброс отработанных палочек в контейнер с дезсредством **Рис. 23**



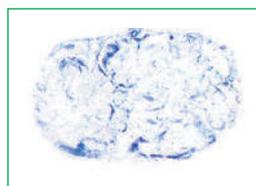
Хорошее качество



Хорошее качество

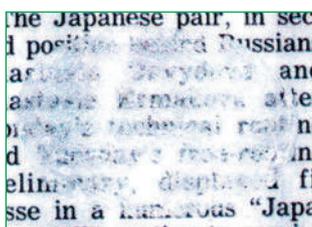


Стекшая мокрота

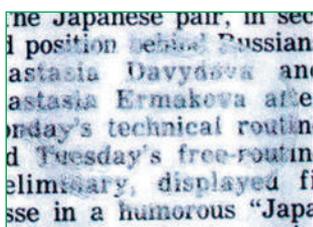


Неравномерно распределенный

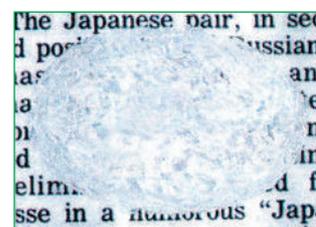
Рис. 24 Равномерность распределения мазка мокроты по предметному стеклу



Хорошее качество мазка



Плохое качество мазка (слишком тонкий слой)



Плохое качество мазка (слишком густой)

Рис. 25 Проверка густоты мазка с помощью печатного текста

3.3.3. Фиксация мазка

Ни в коем случае не допускается фиксация сырых мазков над пламенем горелки! Фиксируйте мазки одним из нижеперечисленных методов.

1-й метод

Высохшие стекла пинцетом или специальными щипцами берут за конец, на котором нанесена маркировка, и 3 раза проводят **через среднюю часть пламени** спиртовки или **верхнюю часть пламени** газовой горелки до исчезновения признаков запотевания стекла (рис. 26). Общая продолжительность пребывания мазка в пламени не должна превышать 3–5 секунд. Затем стекла помещают на специальный поднос или чистую бумагу.

2-й метод

Оставьте мазки на электрическом фиксаторе (65–75 °С) не менее чем на 2 часа (рис. 27).

На рис. 28 (а–в) показана процедура фиксации приготовленных и высушенных мазков над пламенем спиртовки, выполняемая на рабочем месте для окрашивания мазков (непосредственно перед проведением процедуры окрашивания).



Фиксация мазка над пламенем газовой горелки **Рис. 26**



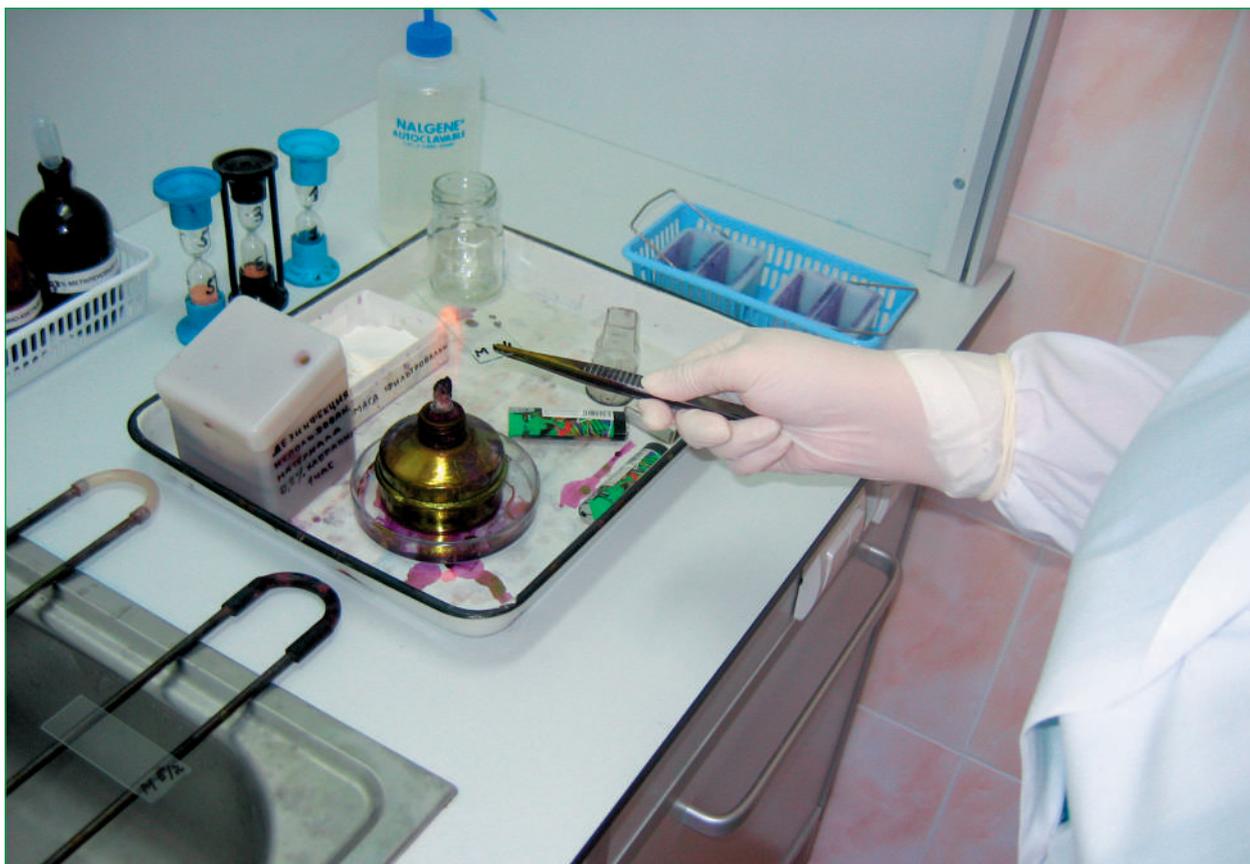
Способ фиксации мазков на электрическом фиксаторе **Рис. 27**



а Рис. 28 Подготовка к выполнению процедуры фиксации мазков (высохшие препараты раскладывают на «рельсах»)



б Рис. 28 Стекла с мазками поочередно берут пинцетом за конец, на который нанесена маркировка



Трижды медленно проводят препарат через среднюю часть пламени спиртовки **Рис. 28**

3.4. Окрашивание кислотоустойчивых микроорганизмов

В отличие от других бактерий микобактерии способны удерживать красители (анилиновый краситель фуксин или флюоресцентные красители) даже после обработки обесцвечивающим раствором кислого спирта или 25% кислоты. Поэтому они и называются кислотоустойчивыми. Для проникновения красителя в бактериальную клетку ее клеточную стенку повреждают фенолом. В случае микроскопии по Цилю–Нильсену применяют также подогрев мазка. Для облегчения распознавания кислотоустойчивых бактерий микроскопистом применяется контрастное по отношению к ним окрашивание фона.

Существует несколько методик окрашивания кислотоустойчивых МБ. При окрашивании карболовым фуксином по методу Циля–Нильсена с контрастированием метиленовым синим кислотоустойчивые микроорганизмы окрашиваются в красный цвет на синем фоне мазка. При окраске флюоресцирующим красителем (аурамин-о, аурамин-родамин), кислотоустойчивые МБ флюоресцируют в мазке от желтого до оранжевого оттенков (окраска варьирует в зависимости от применяемой системы окрашивания) на темном фоне.

3.4.1. Приготовление растворов красителей

Степень чистоты реактивов

Применяемые для исследования реактивы зачастую не являются чистыми, поэтому необходимо корректировать навеску при приготовлении растворов. Как правило,

большинство производителей указывают на упаковке процент чистого вещества, содержащегося в порошке. Правильная навеска определяется вычислением поправочного коэффициента и умножением требуемого количества красителя на поправочный коэффициент.

Например, доля основного фуксина в исходном реактиве (чистота) – 75%. Требуется 3 г основного фуксина:

- разделите 100 на величину процентного содержания фуксина в реактиве для получения поправочного коэффициента:

$$100/75 = 1,33;$$

- умножьте 1,33 на 3 г = 3,99 г.

Таким образом, для получения 3 г красителя необходимо взять 3,99 г исходного реактива.

В случае если порошок с красителем содержит 88% и более чистого вещества, поправочный коэффициент равен и менее 1,13. В этом случае погрешность при взятии навески без учета доли примесей незначительна, и в проведении пересчета нет необходимости.

Фенол

Чистые кристаллы фенола бесцветны; при появлении коричневого окрашивания или коричневых или красных вкраплений такой реактив не следует использовать во избежание получения неудовлетворительно окрашенных мазков.

Для предотвращения окисления фенола лучше приобретать наименьшие (0,5 кг) фасовки этого реактива. Вскрытую фасовку рекомендуется хранить в холодильнике герметично закрытой (натяните резиновую перчатку на закрытое крышечкой горлышко банки).

Приготовление растворов

Общие принципы приготовления растворов

1. Применяйте для взвешивания весы с чувствительностью не менее 0,01 г. При использовании двухчашечных весов (только с фиксированным коромыслом) необходимо использовать наборы разновесов. Используйте только стандартные наборы разновесов. Нельзя использовать загрязненные или заржавевшие разновесы. Никогда не берите разновесы руками – жир с пальцев остается на разновесах, изменяя их вес. Разновесы разрешается брать только пинцетом.
2. При взвешивании легких субстанций избегайте их распыления и вдыхания пыли – применяйте респираторы.
3. При приготовлении растворов вначале растворите исходное вещество в небольшом объеме. В случае реакций растворения, сопровождающихся нагреванием раствора (экзотермических), дождитесь его охлаждения. После растворения вещества доведите объем раствора до требуемого.
4. При доведении объема растворов используйте мерные колбы или цилиндры. Разметка на химических стаканах и конических колбах часто бывает неточной.
5. При доведении объема раствора метка цилиндра или мерной колбы должна находиться на уровне глаз лаборанта. Если метка находится ниже уровня глаз – отмеренный объем будет недостаточен, если выше – избыточен.

Приготовление растворов для метода окраски по Циллю–Нильсену

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. Добиться полного растворения фуксина.

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

- расплавить 5 г кристаллического фенола на водяной бане или в термостате (температура плавления фенола – 41 °С).

Осторожно! При попадании на кожу фенол вызывает ожоги.

- растворить расплавленный фенол в 100 мл воды.

Раствор 3. Рабочий раствор карболового фуксина:

- в 90 мл полученного раствора фенола (*раствор 2*) добавить 10 мл насыщенного раствора фуксина (*раствор 1*).

Раствор 4. Обесцвечивающий раствор *серной кислоты* (25%):

- к 75 мл дистиллированной воды осторожно долить 25 мл концентрированной серной кислоты, постепенно наслаивая ее по стенкам сосуда; смешать; содержимое нагреется;

или обесцвечивающий раствор соляной кислоты (3% солянокислый спирт):

- к 97 мл 96% этилового спирта (х. ч.) осторожно добавить 3 мл концентрированной соляной кислоты (х. ч.).

Всегда медленно добавляйте кислоту в спирт, а не наоборот!

Смесь может нагреться.

Раствор 5. 0,3% рабочий раствор метиленового синего:

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

Рабочие растворы карболового фуксина и метиленового синего должны быть профильтрованы и помещены в герметически закрытые емкости из темного стекла. На каждой должна быть надпись с названием содержащегося в ней раствора, его концентрацией, датой приготовления и сроком годности.

Рабочий раствор карболового фуксина может храниться не более 2–4 недель, так как фуксин, начиная выпадать в осадок, изменяет заданные свойства раствора. Другие рабочие растворы значительно более стойкие при хранении, вместе с тем рекомендуется готовить их одновременно с раствором карболового фуксина, то есть каждые две – четыре недели. Описанный режим приготовления рабочих растворов позволит также добиться экономии расходных материалов.

Задача 4

Сколько надо взвесить основного фуксина для приготовления карболового фуксина в количестве, достаточном для окраски 80 мазков, если чистота фуксина составляет 82% (табл. 2)?

Задача 5

Рассчитайте навеску основного фуксина для получения 150 мл раствора карболового фуксина, если на упаковке фуксина реактива указано: 83% чистого вещества. Методика окраски – по Циллю–Нильсену.

Задача 6

Сколько надо взвесить основного фуксина, метиленового синего, фенола для приготовления 500 мл раствора карболового фуксина и 500 мл раствора 0,3% метиленового синего? Чистота реактивов 89%.

Приготовьте растворы красителей для окрашивания мазков методом Циля–Нильсена.

3.4.2. Окраска мазков методом Циля–Нильсена

Окраску мазков методом Циля–Нильсена рекомендуется проводить в вытяжном шкафу, оборудованном раковиной для окраски мазков. Образец организации рабочего места для окраски мазков представлен на рис. 29.



Рис. 29 Общий вид рабочего места для окраски мазков

Процедура окраски

1. Маркированные предметные стекла с нанесенными на них мазками диагностического материала помещают на специальный штатив так, чтобы они не касались друг друга, а их маркировка (номера) была направлена в одну сторону. На стандартный штатив помещается не более 12 стекол. Кроме того, временной режим и интервалы окрашивания позволяют окрашивать не более 12 мазков одновременно.
2. На фиксированный препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги размером немного меньше предметного стекла, но так, чтобы она закрывала мазок полностью (рис. 30). Фильтровальную бумагу используют для того, чтобы краска не разливалась по стеклу. Одновременно за счет использования фильтровальной бумаги предотвращается возможное осаждение кристаллов краски на мазок.
3. Наливают на бумагу (рис. 31) раствор карболового фуксина (препарат должен быть обильно смочен) и нагревают препарат над пламенем горелки до появления легкого облачка паров, не допуская закипания краски и подсыхания бумаги (рис. 32 а–б, 33). Объем красящего раствора должен быть достаточным для

того, чтобы его повторно не наносить на уже разогретый мазок. В случае высыхания мазка и повторного нанесения красителя нагрейте мазок до появления паров повторно.

4. Мазок оставляют на **5 минут** с красителем, чтобы он проник в клеточную стенку микобактерий и окрасил ее (рис. 34).
5. Пинцетом осторожно снимают фильтровальную бумагу и помещают ее в емкость с дезинфицирующим раствором (рис. 35).
6. Осторожно(!) смывают остатки краски слабой струей проточной воды или водой из резервуара (рис. 36). Вода должна быть комнатной температуры или холодной.
7. После каждой процедуры промывки во избежание разбавления реактивов каждое стекло с мазком пинцетом аккуратно ставят на ребро, чтобы стекли остатки воды (рис. 37).
8. Мазок обесцвечивают 25% раствором серной кислоты (H_2SO_4) или 3% солянокислым спиртом (рис. 38), добиваясь визуального эффекта полного обесцвечивания. Продолжительность процедуры обесцвечивания – **3 минуты**.
9. Мазок промывают проточной водой, как описано ранее (рис. 39).
10. Мазок докрашивают 0,3% раствором метиленового синего (рис. 40) в течение **60 секунд**.
11. Мазок промывают проточной водой, как описано ранее.
12. Мазок высушивают при комнатной температуре в вертикальном положении (рис. 41 а–б). Не следует промокать препарат!



Наложение на препараты полосок фильтровальной бумаги **Рис. 30**



Рис. 31 Нанесение на препараты раствора карболового фуксина



а Рис. 32 Поочередное нагревание препаратов над пламенем спиртовки



Нагревание каждого препарата до появления легкого облачка паров

Рис. 32

6



Способ нагревания препаратов с помощью приготовленной факельной горелки (металлического прута с ватным тампоном, который может использоваться вместо спиртовой горелки для подогревания препаратов при окрашивании карболовым фуксином)

Рис. 33



Рис. 34 Выдерживание подогретых препаратов в течение 5 минут (для того чтобы краситель проник в клеточную стенку микобактерий и окрасил ее)

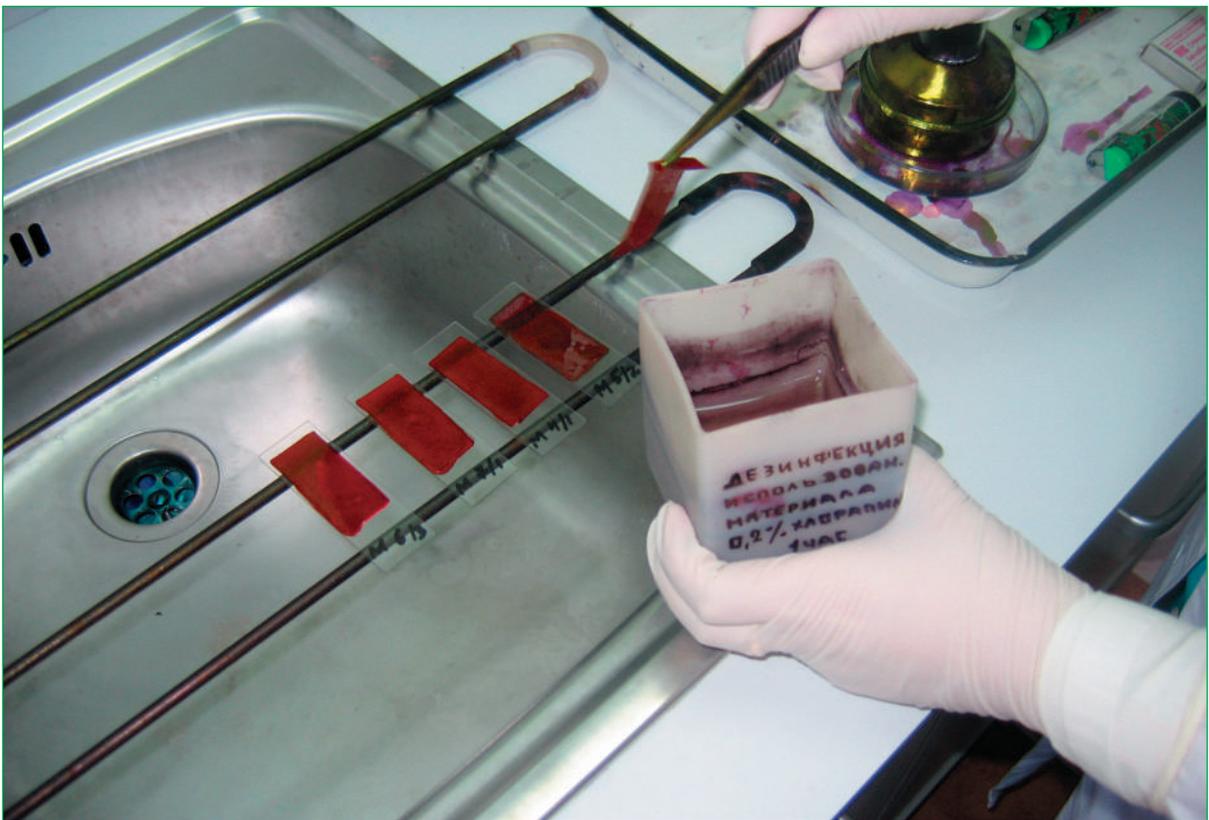


Рис. 35 Удаление полосок фильтровальной бумаги пинцетом в емкость с дезинфицирующим раствором



Смывание остатков краски с препаратов слабой струей воды **Рис. 36**



Удаление остатков воды, выполняемое после каждой процедуры промывки (стекла с мазками поочередно ставят пинцетом на ребро) **Рис. 37**



Рис. 38 Нанесение на препараты обесцвечивающего раствора

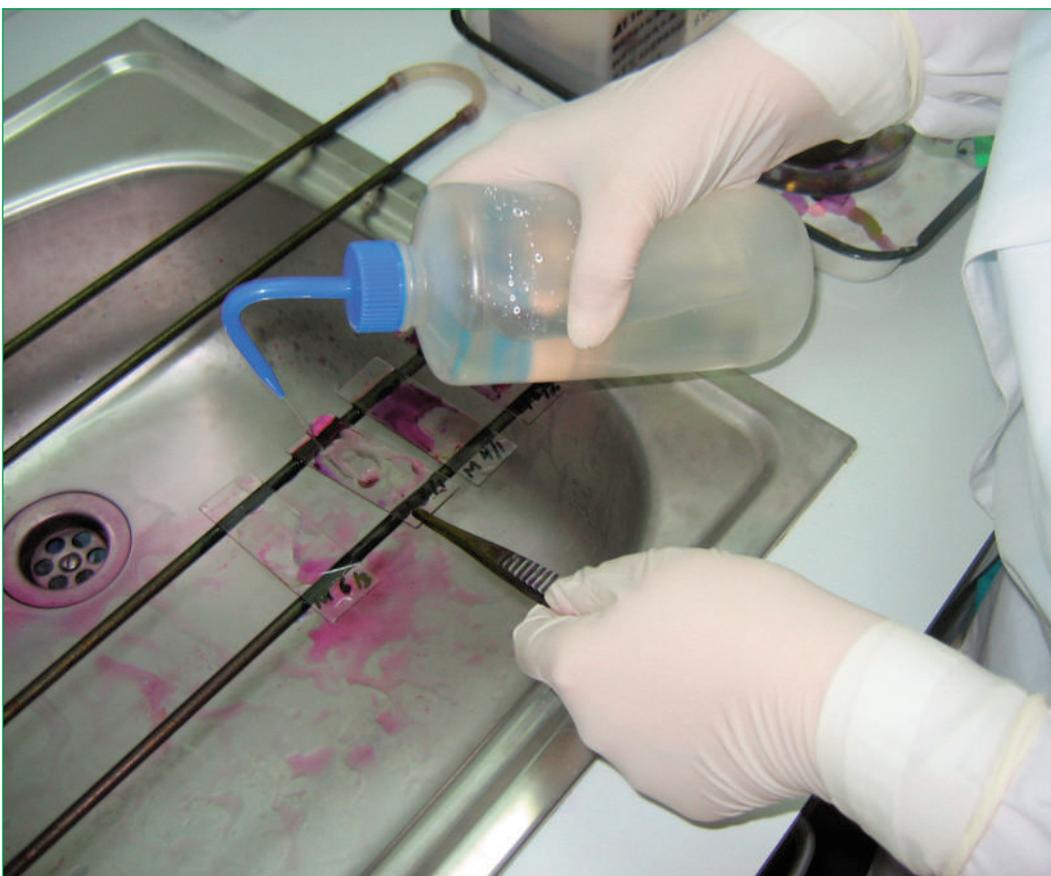


Рис. 39 Промывание препаратов слабой струей воды



Нанесение на препараты раствора метиленового синего **Рис. 40**



Удаление остатков воды после промывки препаратов и помещение стекол с мазками в штатив для сушки мазков **Рис. 41 а**



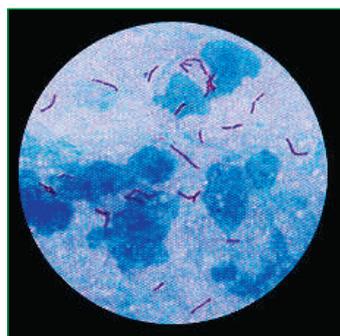
6 Рис. 41 Высушивание препаратов при комнатной температуре в вертикальном положении

В результате микобактерии туберкулеза окрашиваются в малиново-красный цвет, а другие микроорганизмы и клеточные элементы – в голубой. Препарат микроскопируют с масляной иммерсией в световом микроскопе.

При проведении процедуры обесцвечивания мазков рекомендуется визуально оценивать степень обесцвечивания мазка, добиваясь эффекта полного обесцвечивания (до исчезновения красного цвета). При необходимости (неполное обесцвечивание мазка) следует провести повторное обесцвечивание.

Препарат считается недостаточно обесцвеченным в том случае, если в окрашенном мазке мокроты сохраняется пигмент карболового фуксина Циля (рис. 42).

Хорошее качество мазка



Недостаточно обесцвеченный мазок

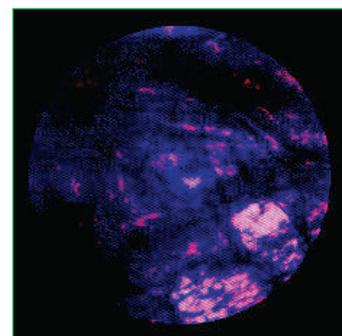


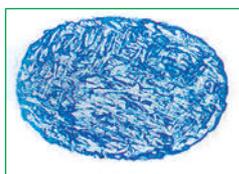
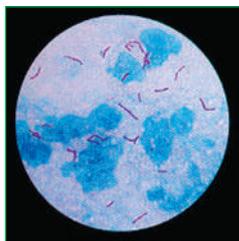
Рис. 42 Оценка правильности выполнения процедуры обесцвечивания мазков в ходе микроскопического исследования полученных препаратов

Считается, что сапрофитные виды микобактерий значительно менее устойчивы к обесцвечиванию, чем патогенные штаммы. В связи с этим наилучшим вариантом является проведение процедуры обесцвечивания мазка с помощью 25% серной кислоты в течение 3 минут, после чего может быть рекомендовано проведение дополнительной обработки мазка 96° этиловым спиртом в течение 5 минут для удаления с мазка кристаллов и остатков краски. Указанный режим обесцвечивания позволяет избежать гипердиагностики КУМ.

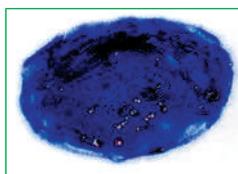
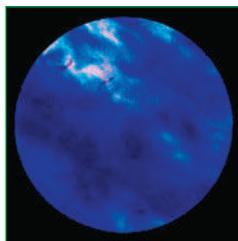
3.5. Возможные ошибки при приготовлении и окраске мазка

- Нельзя уменьшать время экспозиции с раствором солянокислого спирта или серной кислоты. Если микроорганизмы действительно кислотоустойчивые, то под действием обесцвечивающего раствора они не потеряют этого свойства (рис. 42).
- Следует избегать приготовления слишком толстых мазков. Это обстоятельство может воспрепятствовать качественному контакту с обесцвечивающим реактивом, а фоновый краситель может полностью затупить присутствие кислотоустойчивых бактерий. Кроме того, толстые мазки могут отслаиваться, что приводит к потере материала и возможному переносу его на другие мазки. Густота мазка считается приемлемой в том случае, если при микроскопическом исследовании препарата можно нанести резкость на полную глубину в каждом поле зрения (рис. 43).

Хорошее качество мазка



Слишком густой



Слишком тонкий слой

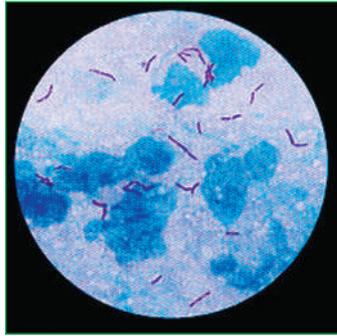


Оценка густоты мазка при микроскопическом исследовании препаратов **Рис. 43**

- Нарушение технологии приготовления и хранения рабочих растворов красителей, а также неполное соблюдение методики окрашивания мазка может привести к наличию в окрашенном препарате мокроты артефактов, грязи, частиц или кристаллов, которые могут появиться в результате перегрева в процессе окраски (рис. 44).
- Слишком интенсивное фоновое окрашивание может маскировать присутствие кислотоустойчивых МБ.

Образцы мазков хорошего и плохого качества представлены на рис. 45.

Хорошее качество мазка



Загрязнение мазка кристаллами

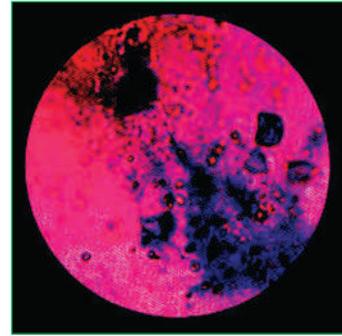


Рис. 44 Оценка чистоты препарата в ходе его микроскопического исследования

| Мазки хорошего качества | Мазки плохого качества | Характеристика мазков плохого качества |
|-------------------------|------------------------|--|
| | | Слишком густой |
| | | Слишком большой Неравномерно распределенный |
| | | Слишком большой Недостаточно обесцвеченный |
| | | Мазок в форме прямой черты Неравномерно распределенный |
| | | Слишком маленький Неравномерно распределенный |
| | | Стекший |
| | | Стекший |
| | | Слишком тонкий слой Неравномерно распределенный |
| | | Неравномерно распределенный Слишком густой Стекший Недостаточно обесцвеченный |

Рис. 45 Внешний вид мазков хорошего и плохого качества

Приготовьте и окрасьте 3–5 мазков из мокроты.

3.6. Микроскопическое исследование препаратов

3.6.1. Методика просмотра мазка

Поскольку человеческий глаз не может различать объекты в диаметре менее 0,1 мм, отдельные бактерии можно увидеть только под микроскопом.

Оптическая система микроскопа позволяет увеличить объект, находящийся в поле зрения микроскописта до размеров, которые могут различаться человеческим глазом.

Кроме кратности увеличения объекта, имеют значение также контрастность и разрешающая способность системы. Для того чтобы быть увиденным через оптическую систему микроскопа, объект должен обладать определенной степенью контрастности с окружающим фоном; для того чтобы создавать четкий увеличенный образ объекта, микроскоп должен обладать разрешающей способностью, достаточной для восприятия отдельных объектов.

Степень контраста может быть значительно увеличена путем окрашивания красителями, которые связываются выборочно либо со всей клеткой, либо с отдельными ее компонентами.

Наиболее распространенными видами микроскопии кислотоустойчивых бактерий являются световая микроскопия с использованием обычного микроскопа проходящего света и люминесцентная микроскопия.

При световой микроскопии проходящего света свет проходит сквозь бактерии, проявляется в вариациях цветовых оттенков, связавшихся с бактериями красителей и показывает форму микроорганизма.

Для исследования мазков, окрашенных по Цилю–Нильсену, используют световой бинокулярный микроскоп с иммерсионным объективом ($\times 100$) и окуляром $\times 7$ – 10 . При микроскопическом исследовании мазка используют различные методы стандартизации этой процедуры.

Как правило, исследование 100 полей зрения достаточно для выявления в мазке единичных кислотоустойчивых бактерий при их концентрации в мокроте около 5–10 тыс. в мл мокроты. У опытного микроскописта на эту работу уйдет приблизительно 5 минут. В мазке площадью $2 \times 1,5$ см количество микроскопических полей зрения от края до края будет примерно соответствовать ста.

При значительном количестве кислотоустойчивых микобактерий в каждом из просматриваемых полей зрения (от 1 до 10 КУМ) допустимо исследовать 50 полей зрения.

При обнаружении более 10 кислотоустойчивых бактерий в 1 поле зрения в каждом из просматриваемых полей достаточно просмотреть 20 полей зрения.

При микроскопическом исследовании мазка, окрашенного методом Циля–Нильсена, необходимо дать количественную оценку препарату (рис. 46 а–г). Определение степени положительности мазка проводится после того, как микроскопист убедится, что во всех просмотренных полях находится количество КУМ, соответствующее утвержденным стандартам оценки. В случае неравномерного распределения КУМ в полях зрения необходимо подсчитать все увиденные КУМ и разделить их на число просмотренных полей зрения.



Рис. 46 Градация результатов микроскопического исследования

Необходима стандартизация процедуры просмотра мазка, чтобы избежать повторного просмотра одного и того же поля, поэтому рекомендуется микроскопировать препарат всегда по одной и той же схеме: либо 1 проход по длине препарата, либо 3 параллельных прохода по ширине мазка, что обеспечивает просмотр 100 полей зрения.

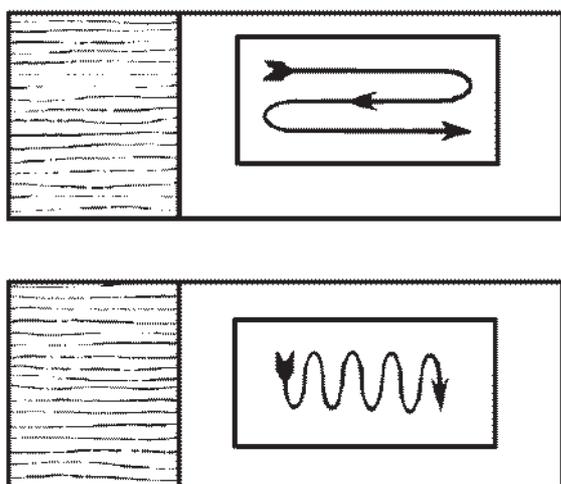


Рис. 47 Схема просмотра 300 полей зрения мазка

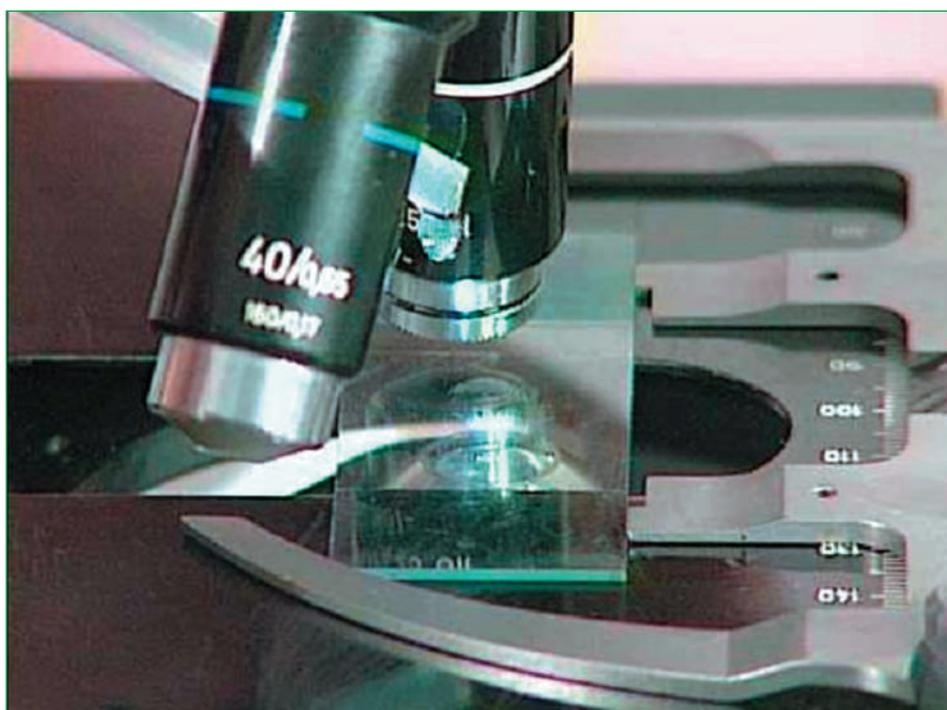
Заключение об отрицательном результате исследования препарата может быть сделано после просмотра 300 полей зрения. В этом случае для того чтобы избежать повторного просмотра полей зрения препарата, его рекомендуется просматривать по следующей схеме (рис. 47):

- 3 параллельных прохода по длине препарата или
- 9 параллельных проходов по ширине препарата.

Наиболее важные этапы процедуры микроскопического исследования мазков, окрашенных методом Циля–Нильсена, представлены на рис. 48–52.



Организация рабочего места для микроскопического исследования **Рис. 48**



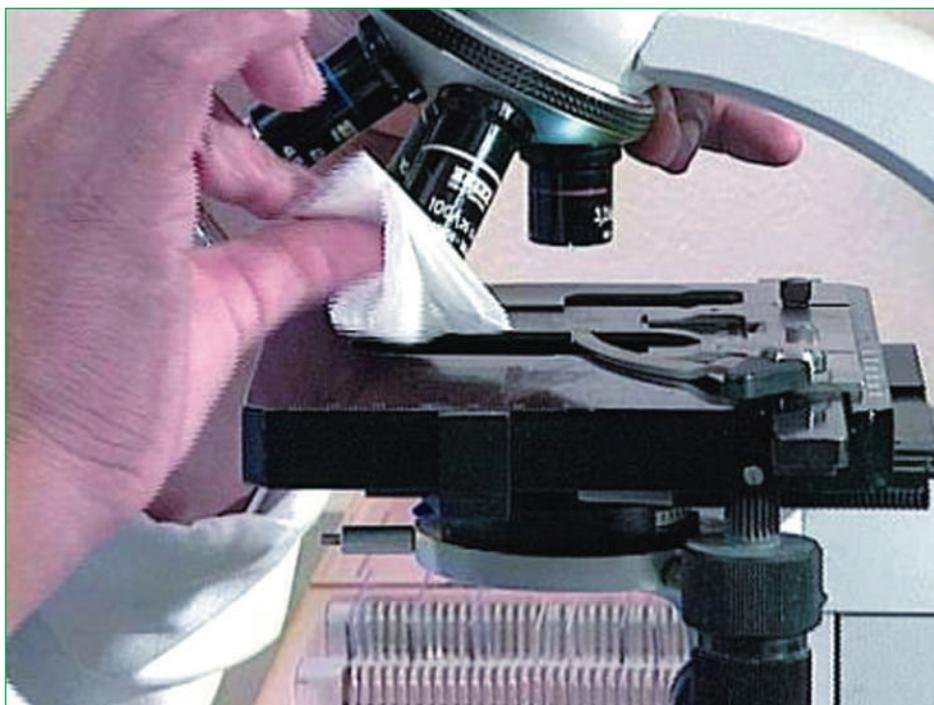
Стекло с мазком помещают на предметный столик непосредственно под объектив и закрепляют его с помощью клемм (или зажимного устройства) препаратоводителя **Рис. 49**



Рис. 50 Поворотом револьверного устройства объектив смещают таким образом, чтобы стал свободным доступ к препарату. Иммерсионное масло капают на мазок, не касаясь поверхности предметного стекла пипеткой, дают маслу свободно стечь (пипетка или капельница масла ни в коем случае не должна соприкоснуться с мазком)



Рис. 51 Процесс микроскопического исследования мазков



После микроскопирования каждого мазка оптику объектива протирают чистой салфеткой для линз во избежание перекрестного переноса кислотоустойчивых бактерий

Рис. 52

Техника просмотра мазка:

- Ежедневно включайте в работу положительный и отрицательный контроли. Положительный контроль гарантирует окрашивающую способность растворов и корректность метода. Отрицательный контроль подтверждает отсутствие в растворах и красителях кислотоустойчивых артефактов.
- Техника просмотра мазка требует систематичности, например, просмотрите мазок по длине несколько раз или зигзагообразно (рис. 47). Тщательно просматривайте каждое поле и затем переходите к следующему.
- Просмотрите минимум 100 полей, прежде чем квалифицировать препарат как отрицательный. Для подтверждения отрицательного результата рекомендуется просматривать дополнительно от 100 до 200 полей зрения, чтобы в случае конечного отрицательного результата было просмотрено не менее 300 полей зрения.
- При наличии в мазке значительного количества 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 – табл. 4).
- После просмотра мазка уберите препарат с предметного столика, проверьте идентификационный номер и запишите результат. Устраните иммерсионное масло с мазка с помощью ксилола, спирта или спиртоэфирной смеси и поместите препарат в специальный ящик для хранения просмотренных препаратов.
- Перед просмотром следующего мазка необходимо протереть объектив микроскопа чистой салфеткой для линз (рис. 52).
- При просмотре мазков в поле зрения могут попадать случайные объекты. Если эти объекты двигаются только вместе с мазком, то, вероятно, они попали в материал мазка вместе с мокротой, реагентами, красителями или иммерсионным маслом.

- Артефакты, которые перемещаются только при вращении окуляров, по всей видимости, находятся на линзах окуляра. Артефакты могут быть также следствием присутствия загрязнителей на линзах конденсора, зеркале или источнике света.
- Сохраняйте все препараты для внешнего контроля качества.

По окончании микроскопического исследования стекла очищают от масла следующим образом:

- положить препарат на покрытый фильтровальной бумагой поднос (лоток) в вытяжной шкаф;
- накрыть препарат полоской фильтровальной бумаги;
- нанести на бумагу 1–2 капли ксилола, спирта или спиртоэфирной смеси;
- через 2–3 минуты фильтровальную бумагу удалить.

Удаление иммерсионного масла рекомендуется производить одновременно со всех просмотренных препаратов или их части по окончании процесса микроскопического исследования. Затем препараты помещают в вертикальном положении (так, чтобы мазки не соприкасались и не загрязнили друг друга) в специальные коробки для хранения мазков.

Просмотренные препараты – все положительные и, по возможности, все отрицательные (или не менее 10% отрицательных) следует хранить для целей внешней оценки качества (ВОК) исследований.

Стекла с мазками хранят до проведения лабораторным куратором выборки мазков (для пересмотра их «слепым» методом в вышестоящей лаборатории). В ходе планового ежеквартального кураторского визита лабораторный куратор должен иметь возможность отобрать по регистрационному журналу все интересующие его препараты и получить их для проведения внешней оценки качества работы лаборатории. В связи с этим стекла с мазками хранят в специальных коробках для хранения мазков в том порядке, в котором проводилось исследование.

3.6.2. Морфологические особенности кислотоустойчивых бактерий

Кислотоустойчивые бактерии представляют собой тонкие, прямые или изогнутые палочки приблизительно 1–10 мкм в длину.

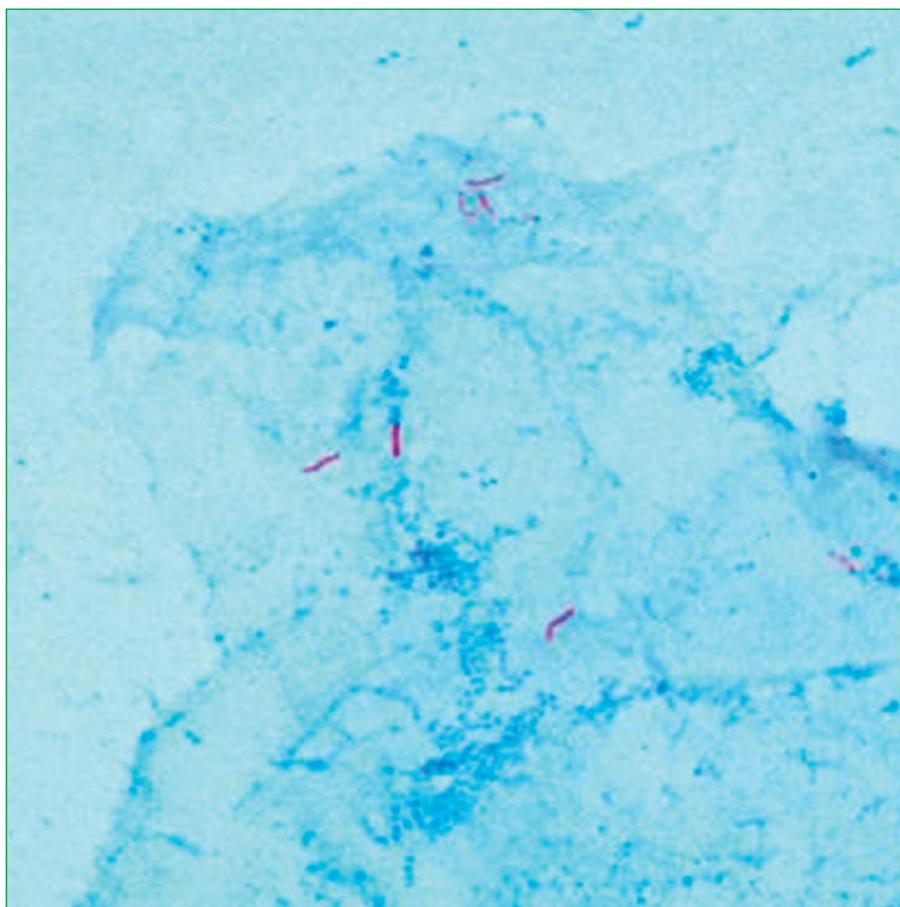
При окраске по методу Циля–Нильсена микобактерии туберкулеза видны в мазке в виде тонких прямых и слегка изогнутых, более или менее гранулированных бактерий, расположенных поодиночке, в парах или группами, которые хорошо различимы на голубом фоне (рис. 53).

У отдельных бактерий на однородно окрашенном фоне в цитоплазме можно увидеть интенсивно окрашенные участки, называемые гранулами.

Некоторые нетуберкулезные микобактерии отличаются полиморфизмом и могут иметь форму удлинённых (до 4 микрон) палочковидных форм, а также могут быть кокковидные формы, с более однородными свойствами окрашивания.

Ряд других микроорганизмов может демонстрировать различную степень кислотоустойчивости. К подобным микроорганизмам относятся *Rhodococcus spp.*, *Nocardia spp.*, *Legionella spp.*, цисты *Cryptosporidium* и *Isospora spp.* и другие микроорганизмы.

Быстрорастущие микобактерии не всегда способны сохранять кислотоустойчивость после обработки кислотами.



Кислотоустойчивые микобактерии при окраске по Цилю–Нильсену. ×1000 **Рис. 53**

Не пытайтесь определить вид микобактерий на основании микроскопического исследования!

3.6.3. Причины ошибок при микроскопии

Ошибки, связанные с исследуемым материалом:

- неудовлетворительное качество материала и/или объем;
- неудовлетворительная обработка многоразовых контейнеров для сбора мокроты, что приводит к появлению ложноположительных результатов;
- невнимательность при маркировке контейнеров – маркировку следует наносить сбоку, а не на крышку контейнера.

Ошибки, связанные с приготовлением мазка:

- недостаточно или плохо освещенная рабочая поверхность;
- ошибка в нумерации мазков;
- использование предметных стекол с ранее положительным результатом (стекла с положительным результатом должны уничтожаться);
- контаминация материала из-за ошибок при использовании петель, пипеток;

- приготовление слишком большого количества мазков (окрашивание одновременно) – при этом возможно перетекание растворов с одного мазка на другой и перекрестная контаминация мазков; рекомендовано приготавливать за 1 раз не более 12 мазков.

Ошибки, связанные с окрашиванием:

- использование поцарапанных предметных стекол – краска, попадая в дефекты, может имитировать бактерии;
- использование нефилтрованного фуксина, который может содержать кристаллы;
- перегрев мазков с фуксином, что может привести к его высыханию и кристаллизации;
- недостаточное обесцвечивание мазка, в результате чего сапрофитные микроорганизмы остаются окрашенными и ошибочно принимаются за микобактерии туберкулеза.

Ошибки, связанные с просмотром мазков:

- ошибочная нумерация после окраски – на отдельных мазках нумерация в процессе окрашивания частично стирается и становится неясной, что приводит к ошибочной подмене мазков;
- присутствие микобактерий в иммерсионном масле, что является результатом существующей практики касания пипеткой или горлышком масленки поверхности положительного мазка;
- невыполнение такой рекомендации, как обязательное протирание линз объектива после просмотра каждого мазка, особенно после положительного;
- ошибочная регистрация результата.

Возможные причины проблем при проведении микроскопических исследований представлены в табл. 3.

Таблица 3

Возможные причины проблем при микроскопии

| Проблема | Возможная причина | Решение |
|---|---|---|
| Нечеткость поля | Конденсор может быть в слишком низком положении; диафрагма конденсора может быть прикрыта | Поднимите конденсор, откройте диафрагму |
| Тени в поле, перемещающиеся вместе с окуляром | Грязный окуляр, плесень на окуляре или объективе, поверхность окуляра может быть поцарапана | Почистить или заменить окуляр |
| Объект виден нечетко | Мазок может быть перевернут, возможно присутствие пузырьков воздуха в масле, масло может быть низкого качества, возможно, испачканы линзы | Переверните мазок, протрите объектив, используйте масло хорошего качества, почистите оптику |
| Плохая видимость | Масло, пыль на линзах, линза может быть испорчена | Почистить оптику или установить новую линзу |

3.6.4. Последствия ложноположительных и ложноотрицательных результатов

Последствия ложноположительных результатов:

- пациентов берут на учет в противотуберкулезный диспансер и назначают ненужное и потенциально вредное лечение токсичными антибактериальными препаратами;
- необоснованно расходуются финансовые средства в связи с проведением ненужного лечения;
- при контроле химиотерапии интенсивная фаза лечения продлевается, что не является необходимостью;
- теряется авторитет и доверие к Национальной противотуберкулезной программе, а также к сотрудникам лабораторий.

Последствия ложноотрицательных результатов:

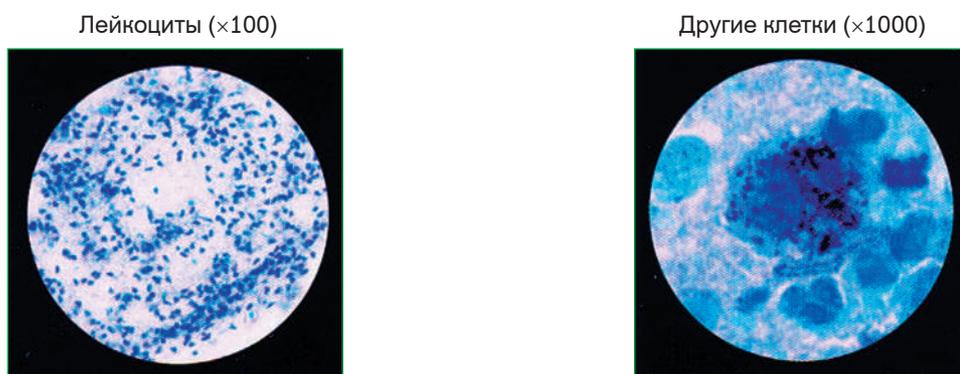
- больные туберкулезом не получают должного лечения, являются очагом инфекции, выявляются с распространенными формами или посмертно;
- интенсивная фаза лечения не продлевается на требуемый период, что приводит к неадекватной химиотерапии;
- теряется авторитет и доверие к Национальной противотуберкулезной программе и сотрудникам лабораторий.

3.7. Регистрация результатов и выдача ответов

3.7.1. Регистрация результатов исследования

Микроскопическое исследование должно выявить в мазке кислотоустойчивые палочковидные формы МБ и определить их количество в поле зрения. Оценка мазка производится после просмотра 100 полей зрения.

В полноценном поле зрения должен присутствовать один из следующих элементов: лейкоциты, альвеолярные макрофаги, эластические волокна и мерцательный эпителий (рис. 54). Поле зрения, не содержащее указанных элементов, не должно быть включено в счет просмотренных полей зрения при просмотре мазка.



- Микроскопическое исследование препаратов мокроты хорошего качества:
- наличие более чем 25 лейкоцитов в поле зрения ($\times 100$);
 - присутствие других клеток (макрофагов)

Рис. 54

Все результаты микроскопии должны заноситься в лабораторный регистрационный журнал 04-ТБ/у (см. раздел 3.7.3), который содержит следующую информацию: лабораторный номер; дату проведения исследования; фамилию, имя, отчество пациента; пол; год рождения; полный адрес места жительства пациента; наименование лечебного учреждения и Ф. И. О. медицинского работника, направившего больного; диагностический материал; цель исследования (диагностика или контроль химиотерапии); результаты микроскопии; подпись ответственного лица и примечания.

В течение календарного года производится непрерывная нумерация выполняемых исследований. В графе «Лабораторный номер» указывается единый лабораторный номер, который присваивается исследованию, включающему в себя три (два) образца мокроты или другого материала, взятых у одного больного. При этом даты проведения исследования этих образцов могут быть различными. Записи производятся в трех выделенных для каждого исследования строках по мере осуществления микроскопического исследования образцов.

В случае направления на исследование пациентов с диагностической целью, следует сделать отметку «✓» в графе «Диагностика».

В случае направления на исследование больного туберкулезом для планового обследования в процессе химиотерапии в графу «Контроль химиотерапии» вписывается региональный регистрационный номер больного туберкулезом (из бланка направления № 05-ТБ/у).

В графе «Примечание» необходимо отметить качество диагностического материала (если оно является неудовлетворительным) – слюна или носоглоточная слизь.

При окраске мазков по методу Циля–Нильсена рекомендуется следующая оценка мазка и представление результатов (табл. 4).

Таблица 4

Градация результатов микроскопического исследования

| Число палочек | Поля | Результат |
|---------------|---------------|--|
| Нет | На 300 полей | Отрицательный, КУМ не обнаружены в 300 полях зрения |
| 1–2 | На 300 полей | Результат не оценивается (необходимо исследовать еще одну порцию мокроты) |
| 1–9 | На 100 полей | Положительный, указать точное количество КУМ, обнаруженных в 100 полях |
| 10–99 | На 100 полей | Положительный, 1+ (от 10 до 99 КУМ на 100 полей зрения) |
| 1–10 | В поле зрения | Положительный, 2+ (1–10 КУМ в 1 поле зрения, в 50 полях зрения) |
| Более 10 | В поле зрения | Положительный, 3+ (более 10 КУМ в 1 поле зрения, в 20 полях зрения) |

Отрицательный результат. Для всех препаратов, в которых в 300 полях зрения не были найдены кислотоустойчивые бактерии, выдается результат «кислотоустойчивые микобактерии (КУМ) не обнаружены» – *отрицательный*.

Результат не оценивается. По данным многочисленных исследований, результат микроскопии «1–3 КУМ на 300 полей зрения» не подтверждается методом посева. Поэтому этот результат трактуется как «сомнительный», в форме ответа такой образец диагностического материала не оценивается. По решению лечащего врача такой анализ должен быть повторен.

Положительный результат. Положительный результат вписывается красными чернилами в лабораторный журнал и в бланк ответа. Число КУМ, найденных в мазке, указывает степень контагиозности больного, а также форму туберкулезного процесса. В связи с этим результаты должны быть представлены в количественном выражении.

Различают 4 уровня положительного ответа:

- единичные – указывается количество КУМ на 100 полей зрения;
- 1+;
- 2+;
- 3+.

3.7.2. Оформление бланков ответов

Заполнение ответов (см. бланк 05-ТБ/у, приведенный ниже, в разделе 3.7.3) следует осуществлять на основании записей в лабораторном регистрационном журнале.

При заполнении ответа в бланк вносится лабораторный номер исследования.

В выданном результате анализа должны содержаться:

- даты проведения исследования;
- результаты микроскопических исследований (качественная и количественная оценка результатов);
- дата выдачи результата;
- подпись микроскописта.

В бланке ответа 05-ТБ/у следует также отметить внешний вид мокроты в доставленном образце: слизисто-гнойная; окрашенная кровью; слюна или носоглоточная слизь.

Результат микроскопических исследований должен выдаваться как можно скорее, желательно не позднее 24 часов с момента поступления последней порции материала в лабораторию.

О положительном результате исследования необходимо *немедленно* сообщить врачу, направившему пациента на обследование.

Результат исследования всегда направляется в учреждение здравоохранения, направившее анализ!

Никогда не выдавайте результат только больному! В случае если он/она не сообщит о результате своего анализа в учреждение здравоохранения, то он может продолжать являться неизвестным диспансеру источником инфекционного очага и не получить своевременного лечения.

При отрицательном результате анализа мокроты ответ по форме 05-ТБ/у не выдается, пока не проведено исследование всех трех (в крайнем случае – двух) проб мокроты. В случае если 2-я или 3-я пробы мокроты не поступают в лабораторию длительное время, лаборатория выдает результат врачу через установленное для данного медучреждения число дней, но не менее чем через неделю.

О положительном результате анализа лаборатория сообщает врачу, направившему на исследование материал, **НЕМЕДЛЕННО!**

3.7.3. Образцы учетно-отчетных форм

Образцы учетно-отчетных форм (журнал регистрации микроскопических исследований на туберкулез, форма 04-ТБ/у; направление на проведение микроскопических исследований на туберкулез, форма 05-ТБ/у; сопроводительный лист доставки диагностического материала для микроскопического исследования на туберкулез, форма 04-2-ТБ/у) представлены на стр. 81–83.

Вопросы

1. Сколько полей зрения нужно просмотреть, если мазок оценен:
 - как отрицательный;
 - как сомнительный;
 - как положительный, содержащий единичные КУМ;
 - как положительный 1+;
 - как положительный 2+;
 - как положительный 3+?
2. Что такое КУМ? Почему при микроскопии мазка после кислотоустойчивого окрашивания мы даем ответ КУМ, а не МБТ или БК+?
3. Кто принимает решение о наличии у больного туберкулезного заболевания и на основании каких данных?
4. Что означает ответ «сомнительный результат»? Каковы действия врача при выдаче такого ответа в случае: а) диагностических исследований; б) результата, полученного при исследовании слюны; в) при исследованиях с целью контроля химиотерапии; г) то же, при исследовании слюны; д) при многократно повторяющихся сомнительных результатах?

ЖУРНАЛ
регистрации микроскопических исследований на туберкулез

Год _____

| 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 |
|--------------------|------------------------------|------------------------|-----|--------------|---|--|----------|-------------------|-------------------------|----|---------|------------------------|-----------------------------|------------|
| | | | | | | | | Диагностика | Контроль химио-терапии* | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | |
| | | | | | | | | | | 1 | | | | |
| | | | | | | | | | | 2 | | | | |
| | | | | | | | | | | 3 | | | | |
| | | | | | | | | | | 1 | | | | |
| | | | | | | | | | | 2 | | | | |
| | | | | | | | | | | 3 | | | | |
| | | | | | | | | | | 1 | | | | |
| | | | | | | | | | | 2 | | | | |
| | | | | | | | | | | 3 | | | | |
| | | | | | | | | | | 1 | | | | |
| | | | | | | | | | | 2 | | | | |
| | | | | | | | | | | 3 | | | | |
| | | | | | | | | | | 1 | | | | |
| | | | | | | | | | | 2 | | | | |
| | | | | | | | | | | 3 | | | | |

* Вписать региональный регистрационный номер больного туберкулезом

| |
|-------------------|
| Наименование ЛПУ: |
| Адрес: |
| Подразделение: |

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 _____
(переносится 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:

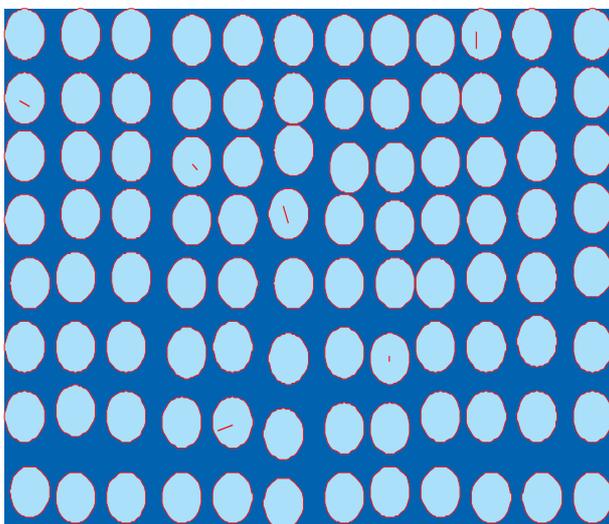
Задача 7

Проведите оценку результатов микроскопии препаратов, при исследовании которых было обнаружено:

- а) 9 КУМ в 100 полях зрения;
- б) 120 КУМ в 100 полях зрения;
- в) более 10 КУМ в каждом поле зрения;
- г) от 1 до 9 КУМ в большинстве полей зрения;
- д) ни одной КУМ в 300 полях зрения;
- е) 2 КУМ в 300 полях зрения.

Задача 8

Выполните количественную оценку препаратов, представленных на рисунке 55 а–з



а Рис. 55

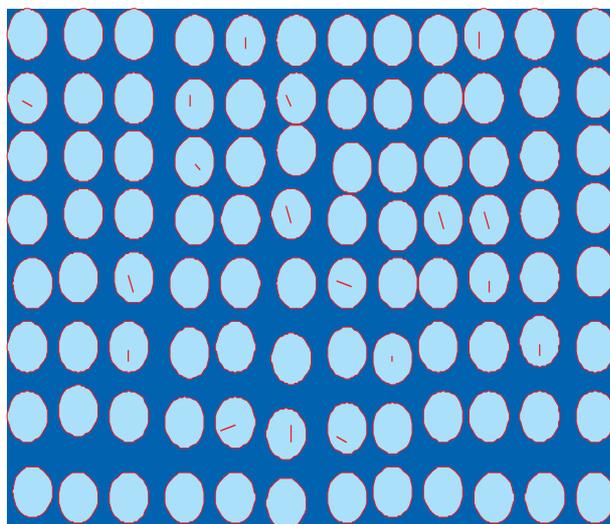
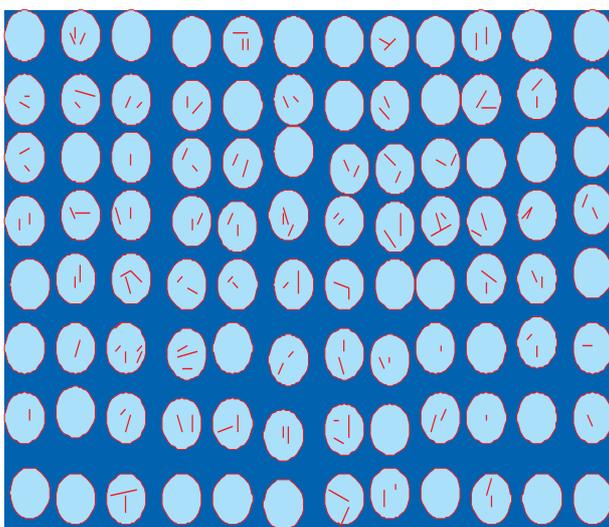


Рис. 55 б



в Рис. 55

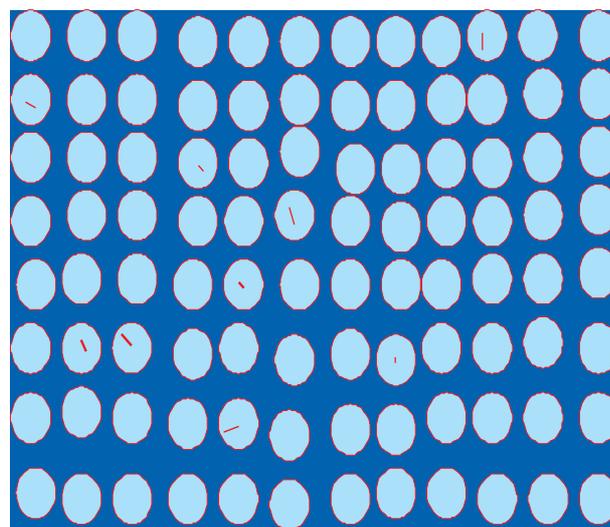
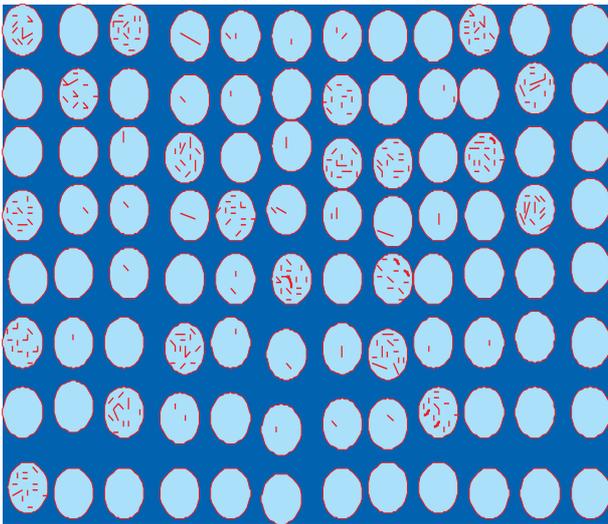


Рис. 55 г



д Рис. 55

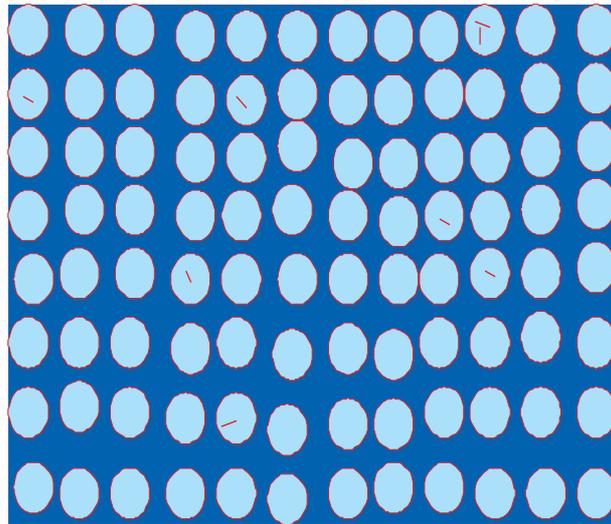
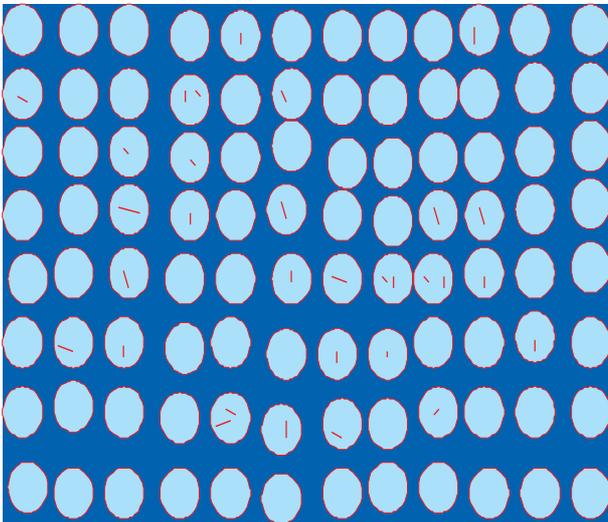


Рис. 55 е



ж Рис. 55

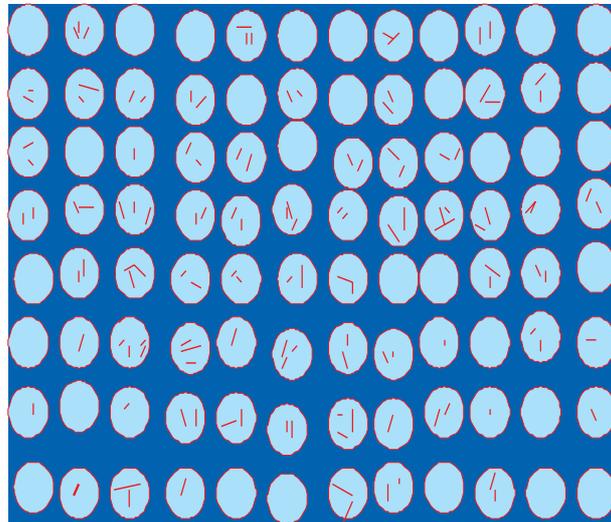


Рис. 55 з

Задача 9

Просмотрите образец страницы журнала № 04-ТБ/у, представленный на стр. 86, и проверьте правильность заполнения всех колонок журнала. Проанализируйте, удовлетворительно ли организовано микроскопическое исследование методом Циля–Нильсена, подсчитайте выявляемость и кратность обследования (методику расчета см. ниже, в разделе 4.1, стр. 93).

Пример заполнения лабораторного регистрационного журнала микроскопических исследований

| 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. специалиста, направившего больного | Материал | Цель исследования | | Образец | Результат исследования | Подпись ответственного лица | Примечание |
|--------------------|------------------------------|------------------------|-----|--------------|---|--|----------|-------------------|-------------------------|-------------|------------------------|-----------------------------|------------|
| | | | | | | | | Диагностика | Контроль химио-терапии* | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| 629 | 21/5 | Савин А.К. | М | 20/03/1970 | с. Дальнее, д. 23 | ФАП с. Дальнее | | | 311 | 1 | ОТР | Иванова | |
| 630 | 21/5 22/5 | Королев С.М. | М | 28/02/1959 | д. Загорянка, ул. Стальная, 2 | ФАП д. Загорянка | | ✓ | | 1 2 3 | 2+ 2+ 3 | Иванова | |
| 631 | 22/5 23/5 24/5 | Снарлов О.Б. | М | 5/04/1974 | пос. Строитель, д. 2, кв. 4 | ЦРБ Поликлиника Иванова С.И. | | ✓ | | 1 2 3 | ОТР ОТР ОТР | Иванова | |
| 632 | 22/5 25/5 | Фролова О.П. | Ж | 3/01/1954 | д. Леоново, д. 3 | ФАП д. Леоново | | ✓ | | 1 2 3 | ОТР ОТР ОТР | Иванова | |
| 633 | 23/5 24/5 24/5 | Китаева Э.В. | Ж | 1/02/1935 | пос. Строитель, д. 34, кв. 56 | ЦРБ Тер. отделение Ивкина О.П. | | ✓ | | 1 2 3 | ОТР ОТР ОТР | Иванова | |
| 634 | 24/5 24/5 27/5 | Иванов В.А. | М | 23/03/1948 | д. Петровское, д. 1 | ФАП д. Петровское | | ✓ | | 1 2 3 | ОТР ОТР ОТР | Иванова | |
| 635 | 24/5 | Егоров А.И. | М | 14/09/1957 | д. Манино, д. 7 | ФАП д. Манино | | ✓ | | 1 2 3 | ОТР ОТР ОТР | Иванова | |
| 636 | 26/5 28/5 | Петров В.А. | М | 2/01/1960 | пос. Строитель, д. 26, кв. 15 | ЦРБ Поликлиника Иванова С.И. | | ✓ | | 1 2 3 | ОТР ОТР ОТР | Иванова | |
| 637 | 30/5 1/6 | Дяева О.И. | Ж | 25/07/1982 | д. Петровское, д. 5 | ФАП д. Петровское | | ✓ | | 1 2 3 | ОТР ОТР ОТР | Иванова | |

* Вписать региональный регистрационный номер больного туберкулезом

Задача 10

Внесите данные о больных и результаты исследования в лабораторный журнал регистрации 04-ТБ/у и в бланки ответов 05-ТБ/у. Отметьте, в каких случаях результаты лабораторного исследования недостоверны.

1. Николаев П.П., м., 33 года, Красных партизан, 15, кв. 6, для диагностики
1-я проба 23.03.04 115 КУМ в 50 полях зрения – слизисто-гнойная
2-я проба 25.03.04 20 КУМ в 100 полях зрения – слизисто-гнойная
3-я проба 26.03.04 0 КУМ в 300 полях зрения – слюна
2. Петров А.М., м., 24 года, Новозаводская, 115, кв. 11, для диагностики
1-я проба 23.03.04 450 КУМ в 30 полях зрения – окрашена кровью
2-я проба 25.03.04 8 КУМ в 100 полях зрения – слюна
3-я проба 26.03.04 78 КУМ в 100 полях зрения – слизисто-гнойная
3. Егоров К.Н. м., 68 лет, Центральная, 36, контроль химиотерапии, рег. № П2-56
1-я проба 23.03.04 2 КУМ в 300 полях зрения – слизисто-гнойная
2-я проба 25.03.04 0 КУМ в 300 полях зрения – слизисто-гнойная
4. Алехин Ф.Н., м., 56 лет, пос. Новый, контроль химиотерапии, рег. № П1-104
1-я проба 23.03.04 67 КУМ в 100 полях зрения – слизисто-гнойная
2-я проба 27.03.04 0 КУМ в 300 полях зрения – слюна

Задание 4

Проведите микроскопическое исследование приготовленных мазков. В том случае, если мазок положительный – оцените степень его положительности. Оцените качество приготовления и окраски мазка.

Задание 5

Проведите микроскопическое исследование набора контрольных образцов с различным содержанием КУМ, используя качественную и количественную оценку результатов исследования.

3.8. Ответы к задачам

1

Фуксин основной – 157,5 г.
Метиленовый синий – 157,5 г.
Серная кислота концентрированная, х. ч. – 13 125 мл.
Фенол – 2 625 г.
Предметные стекла – 10 500.

2

Фуксин основной – 170 г.
Метиленовый синий – 220 г.
Серная кислота х. ч., концентрированная – 22 500 мл.
Фенол – 4500 г.
Предметные стекла – 17 500.

- 3 По 615 мл каждого красителя.
- 4 1,46 г фуксина.
- 5 0,54 г.
- 6 Фуксин основной – 1,5 г.
Фенол – 25 г.
Метиленовый синий – 1,5 г.
- 7 а) Положительный, содержащий единичные КУМ.
б) Положительный, 2+.
в) Положительный, 3+.
г) Положительный, 2+.
д) Отрицательный.
е) Результат не оценивается – исследование необходимо повторить.
- 8 а) Положительный, единичные – 6 КУМ.
б) Положительный, 1+.
в) Положительный, 2+.
г) Положительный, единичные – 9 КУМ.
д) Положительный, 3+.
е) Положительный, единичные – 8 КУМ.
ж) Положительный, 1+.
з) Положительный, 2+.
- 9 Число лиц, обследованных с целью диагностики, – 8, из них с положительными результатами микроскопии – 1. Выявляемость составляет 12,5%.
Число проведенных исследований у лиц, обследованных с целью диагностики, – 18. Кратность обследования составляет 2,25.
- 10 Николаев П.П. 1-я проба – пол. – 2+
2-я проба – пол. – 1+
3-я проба – отр. (недостовверный результат)
- Петров А.М. 1-я проба – пол. – 3+
2-я проба – пол. – единичные 8 КУМ/100 п. з.
3-я проба – пол. – 1+
- Егоров К.Н. 1-я проба – ответ не выдается – 2 КУМ/300 п. з.
2-я проба – отр.
- Алехин Ф. Н. 1-я проба – пол. – 1+
2-я проба – отр. (недостовверный результат).

4.1. Внутрिलाбораторный контроль качества

Внутрिलाбораторный контроль качества микроскопического исследования для выявления КУМ – это процесс эффективного и систематического отслеживания ежедневной работы в лаборатории.

Функционирование этой программы гарантирует, что информация, полученная в ходе исследований, точна, надежна и воспроизводима. Это достигается оценкой качества поступающего материала, наблюдением за техникой микроскопии, приготовлением реагентов, уходом за оборудованием, использованием стандартизованных методов, сопоставлением полученной информации с установленными критериями, а также контролем за правильностью регистрации результатов.

Внутрिलाбораторный контроль качества должен осуществляться на регулярной основе во всех лабораториях.

Внутрिलाбораторный контроль качества – это ответственность каждого сотрудника лаборатории!

В рамках программы внутрिलाбораторного контроля качества необходимо проводить:

- планирование расположения функциональных зон лаборатории и оборудования;
- контроль качества доставленного материала;
- контроль за обработкой материала;
- соблюдение утвержденных стандартизованных методик;
- использование качественных реагентов;
- правильную и своевременную выдачу результатов.

В основе системы обеспечения качества исследований лежат:

- адекватно обученный, мотивированный и сплоченный персонал;
- применение утвержденных стандартизованных методик;
- готовность признавать и исправлять ошибки;
- эффективная связь между координаторами и лабораторными специалистами: лаборатория должна своевременно информироваться о результатах внешнего контроля качества и принимать соответствующие меры по исправлению недостатков; координатор должен проверить исправление недостатков и контролировать улучшение качества исследований.

Соблюдение стандартных методик

Лаборатории, осуществляющие исследования для диагностики и контроля химиотерапии туберкулеза, должны использовать только утвержденные в стране методики. Описание выполнения каждой методики, используемой в лаборатории, должно храниться в доступном месте, например, крепиться на стене возле рабочего места. Любые отступления от методики следует согласовывать с лабораторным координатором.

Лабораторное оборудование

- Обращение с оборудованием должно соответствовать требованиям и спецификациям производителя.
- Руководство по эксплуатации всего оборудования следует держать в доступном месте.
- В паспорта к оборудованию регулярно вносятся даты сервисного обслуживания.
- Оборудование регулярно проверяется специалистом, который обеспечивает правильность и точность настроек оборудования.

Диагностический материал и направление на анализ

- Анализы выполняются только при наличии сопровождающей заполненной формы направления. Недопустимо проведение исследований на основании устного запроса, без соответствующего письменного направления.
- Направления и другие сопроводительные документы должны доставляться отдельно от контейнеров с мокротой. Направления, загрязненные материалом, должны быть автоклавированы или подвергнуты термической обработке в сухожаровом шкафу.
- В направлении должна быть представлена полная информация о больном: имя, фамилия, адрес, возраст, пол, цель исследования, регистрационный номер больного при условии анализа для контроля химиотерапии, фамилия направившего врача и медучреждения, дата сбора материала, номер порции материала. На контейнере также должна быть информация для однозначной идентификации пробы. Не принимайте контейнеры, на которых невозможно разобрать надпись.
- Отмечайте характер диагностического материала в лабораторном журнале и в бланке результатов исследования. Для облегчения оформления ответов целесообразно изготовить печать с подобным комментарием.
- Немедленно стерилизуйте (автоклавированием, кипячением, химической обработкой) разбитые или протекающие контейнеры с мокротой и направьте запрос на повторный сбор мокроты.

Реагенты и красители

Все реактивы, используемые для окраски мазков методом Циля–Нильсена, должны соответствовать ГОСТам и иметь степень очистки не менее категории «химически чистый». На всех флаконах с реагентами должны быть проставлены даты получения и даты открытия нового флакона. Любой реактив неудовлетворительного качества немедленно выбрасывается и делается соответствующая запись в журнале учета реактивов.

Необходимо контролировать оборот запасов на складе (первыми использовать те реактивы и красители, срок годности которых подходит к концу).

В лаборатории всегда должен быть запас реактивов и расходных материалов в соответствии с ее функциями и уровнем.

Окрашивание и микроскопия мазков

- Сохраняйте исследуемые образцы до окончания микроскопического исследования.
- Окрашивайте мазки партиями максимум по 12 штук.

- Ежедневно включайте в работу положительный и отрицательный контрольные препараты.
- Просмотр контрольных мазков должен осуществляться до просмотра мазков от пациентов.

Контроль не выдержан в следующих случаях:

- 1) КУМ в положительном контроле не окрашены в красный цвет;
- 2) в отрицательном контроле фон остается красным после обесцвечивания;
- 3) в отрицательном контроле обнаружены КУМ;
- 4) некачественное фоновое окрашивание.

- Результаты просмотра контрольных мазков необходимо фиксировать в специальном журнале.

Пример журнала контроля качества окраски:

| Дата | Контрольный мазок | Оценка положительности мазка | Качество мазка | Комментарии | Подпись лаборанта |
|----------|-------------------|------------------------------|----------------|--------------------------------------|-------------------|
| 24.03.04 | положительный | 3+ | удовл. | | Иванова |
| | отрицательный | отр. | удовл. | | Иванова |
| 25.03.04 | положительный | 3+ | удовл. | | Михайлова |
| | отрицательный | 5/100 | неудовл. | переделаны красители, заменено масло | |

- После ликвидации причины низкого качества мазков перекрасьте все мазки, а также контроли. Результаты микроскопии контрольных мазков внесите в журнал контроля качества окраски.

Причины неудовлетворительного качества контрольного мазка должны быть выявлены и устранены. Действия по исправлению причин низкого качества и результат микроскопии контрольных мазков после их исправления должны быть отражены в журнале контроля качества.

- Очищайте предметные стекла с мазками от иммерсионного масла с помощью ксилола, спирта или спиртоэфирной смеси. Храните мазки в специальных ящиках для внешнего контроля качества.
- Храните все положительные и отрицательные мазки для программы внешнего контроля качества, согласно принятым стандартам.

Регистрация и выдача результатов

- Выдача полученных результатов должна осуществляться в кратчайшие сроки, предпочтительно в течение 24 часов с момента получения последней порции материала¹.
- Регулярно анализируйте результаты микроскопии, еженедельно или ежемесячно высчитывая процент положительных результатов. Следует обращать внимание на резкие отклонения от средних показателей работы лаборатории. В случае любого отклонения от нормы следует выявлять его причину и устранять ее.
- При анализе журнала 04-ТБ/у необходимо обращать особое внимание на случаи, когда в нескольких мазках подряд (от разных пациентов) определяется высокое содержание КУМ (1 и более в поле зрения). Это может быть результатом переноса КУМ с одного мазка на другой во время приготовления мазков, их окраски или бактериоскопии.
- 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 по форме, представленной ниже.

Образец отчета о работе лаборатории

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ ОТЧЕТ ЛАБОРАТОРИИ (заполняется совместно с фтизиатром)

Наименование лаборатории _____

Отчетный период _____

| | Число обследованных пациентов | Число мазков |
|--|----------------------------------|--------------|
| Всего | | |
| Для диагностики | | |
| Всего положительных | | |
| Положительные для новых случаев | | |

Отчет, составленный по указанной форме, необходимо ежемесячно предоставлять областному (районному или городскому) координатору лабораторной службы.

В графе «**Всего**» указывают количество всех пациентов, обследованных методом микроскопии (для диагностики и контроля химиотерапии), и число исследований, проведенных за истекший месяц.

В графе «**Для диагностики**» указывают количество обследованных пациентов и проведенных анализов с целью диагностики. Это количество должно согласовываться с координатором-фтизиатром, поскольку в журнале 04-ТБ/у могут быть отмечены

¹ Время ожидания второй и/или третьей порции материала в каждой конкретной лаборатории должно быть определено совместно с ТБ-координатором в зависимости от нагрузки лаборатории и возможности доставки материала в лабораторию в данной местности. Ответ в случае отрицательного результата выдается не позже чем через 24 часа после получения последней порции диагностического материала и не позже максимально установленного срока ожидания повторных порций.

как диагностические пациенты, обследуемые с целью диагностики, так и те, кто обследуется для контроля химиотерапии.

В графе «**Всего положительных**» указывается число всех пациентов с положительным мазком (для диагностики и контроля химиотерапии), а также всех положительных мазков.

В графе «**Положительные для новых случаев**» указывается число пациентов с положительным мазком и число положительных мазков среди обследованных с целью диагностики.

Из приведенных в таблице данных вы можете вычислить нагрузку лаборатории, кратность обследования диагностических больных, эффективность микроскопии.

Пример. Лаборатория N представила следующий отчет о работе за апрель.

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ ОТЧЕТ ЛАБОРАТОРИИ (заполняется совместно с фтизиатром)

Наименование лаборатории N

Отчетный период 26 марта – 25 апреля

| | Число обследованных пациентов | Число мазков |
|--|----------------------------------|--------------|
| Всего | 45 | 105 |
| Для диагностики | 30 | 82 |
| Всего положительных | 3 | 8 |
| Положительные для новых случаев | 2 | 6 |

Для определения **нагрузки лаборатории** необходимо число всех исследованных мазков (105) разделить на число рабочих дней.

Например, в апреле число рабочих дней составило 22. Среднее число мазков,готавливаемых ежедневно, составляет 4,8 мазка, т. е. средняя нагрузка составляет 4–5 мазков в день.

Максимально допустимая нагрузка на 1 микроскописта в день при микроскопии по Циллю–Нильсену составляет 20 мазков, минимальная, обеспечивающая поддержание профессионального уровня микроскописта, – 2–3 мазка в день. Таким образом, в лаборатории N нагрузка в апреле была умеренная.

Для определения **кратности обследования для диагностики** число мазков, сделанных для диагностики (82), необходимо разделить на число пациентов, обследованных с целью диагностики (30).

Кратность по данным вышеприведенного отчета составляет 2,7. Для диагностики требуется трехкратное обследование. Средняя кратность 2,7 показывает, что не все пациенты были обследованы трехкратно. Однако доля пациентов, обследованных трехкратно, достаточно высока.

Для определения **эффективности микроскопии** надо число новых пациентов с положительным мазком (2) разделить на число всех пациентов, обследованных для диагностики (30), и умножить на 100%.

В приведенном примере эффективность составила 6,7%.

4.2. Внешняя оценка качества

Внешняя оценка качества исследований – это оценка качества работы лаборатории внешними структурами – ФСВОК, лабораторными экспертами в ходе инспекторских визитов и др.

Внешняя оценка качества необходима:

- для подтверждения соответствия качества проводимых в лаборатории исследований установленным критериям;
- оценки надежности и воспроизводимости получаемых лабораторией результатов;
- планирования обучения персонала.

Существует несколько различных форм внешней оценки качества работы лаборатории, например: кураторские визиты, повторное исследование образцов, панельное тестирование. Рассмотрим более подробно каждую из этих форм.

Кураторские визиты

Одной из наиболее эффективных форм оценки качества работы лаборатории являются кураторские визиты.

Во время такого визита наиболее квалифицированный специалист по микробиологической диагностике туберкулеза, назначенный *Координационным советом областной, районной или городской Программы борьбы с туберкулезом, Управлением здравоохранения и/или главным специалистом по клинической лабораторной диагностике*, имеет возможность на месте выявить ошибки в работе, 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.

Внимание в ходе визитов уделяется следующему:

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

Кроме того, в ходе визита куратор производит выборку образцов окрашенных мазков для последующего реанализа их в вышестоящей 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, влияющих на качество исследования, и должен в кратчайшие сроки проверить результаты их исправления.

По результатам каждого визита куратор составляет справку (оценочный отчет) в двух экземплярах о работе лаборатории по проведению микробиологических исследований с целью выявления, диагностики и контроля химиотерапии туберкулеза (см. ниже).

Образец справки, предоставляемой куратором руководителю курируемой лаборатории после каждого визита

ОЦЕНКА

Работы лаборатории _____

Во время кураторского визита _____

Дата _____

Оценка работы лаборатории

| № | Характеристика | Удовлетворительно | Неудовлетворительно |
|---|---|-------------------|---------------------|
| 1 | Регистрация результатов | | |
| 2 | Качество и количество реактивов и растворов | | |
| 3 | Соблюдение стандартной методики | | |
| 4 | Качество мазков | | |
| 5 | Состояние оборудования | | |
| 6 | Соблюдение техники безопасности | | |

Рекомендации

Оценка организации выявления больных

| № | Характеристика | Число | Удовлетворительно | Неудовлетворительно |
|---|--|-------|-------------------|---------------------|
| 1 | Число обследованных с целью диагностики | | | |
| 2 | Эффективность микроскопии для новых случаев, % | | | |
| 3 | Доля слюны в образцах (по журналу), % | | | |
| 4 | Кратность обследования | | | |

Рекомендации

Один заполненный экземпляр справки предоставляется руководителю инспектируемой лаборатории. Второй экземпляр хранится в досье на лабораторию, находящемся у лабораторного координатора.

В указанную справку (оценочный отчет) включены как характеристики работы самой лаборатории, так и характеристики организации выявления больных в данном медучреждении.

Последние часто не зависят от работников лаборатории, однако эти показатели получают при анализе данных работы лаборатории и отражаются на эффективности ее работы.

Таким образом, качество организации выявления больных туберкулезом в лечебно-профилактическом учреждении значительно влияет на эффективность работы лаборатории.

Рассмотрим, как оценивается каждая из позиций данного отчета.

Характеристика работы лаборатории

Качество регистрации результатов оценивается положительно, если лабораторный журнал 04-ТБ/у, форма ответов 05-ТБ/у и журнал контрольных мазков ведется в соответствии с требованиями.

Качество и количество реактивов и растворов оценивается положительно:

- если в наличии имеется запас реактивов (спирт, фенол, фуксин, метиленовый синий, кислота серная или соляная) и расходных материалов (например, предметные стекла), достаточный для проведения бесперебойных микроскопических исследований в данной лаборатории;
- условия и сроки хранения реактивов соответствуют нормам;
- в лаборатории имеются методики приготовления растворов;
- имеются весы с чувствительностью 0,01 г;
- флаконы с реактивами правильно подписаны (указаны название раствора, концентрация и дата приготовления) и не содержат осадка на дне или стенках;
- внешний вид реактивов соответствует стандарту (фенол имеет вид бесцветных кристаллов, раствор карболовой кислоты бесцветен).

Соблюдение стандартной методики оценивается удовлетворительно, если лаборант демонстрирует знание стандартной методики. На видном месте имеется инструкция «Окрашивание мазков по методу Циля–Нильсена», а над столом микроскопии – инструкция по градации степени положительности мазка; при этом все имеющиеся инструкции соответствуют действующим нормативным документам и методическим указаниям по микробиологической диагностике туберкулеза, утвержденным в установленном порядке.

Качество мазка. Согласно имеющимся отечественным нормативным документам и рекомендациям ВОЗ, размер мазка должен составлять 1×2 см, толщина мазка в высушенном, неокрашенном состоянии позволяет прочитать газетный текст на расстоянии 5–10 см.

При удовлетворительной окраске кислотоустойчивые бактерии представлены в виде тонких, слегка изогнутых палочковидных форм красного цвета, располагающихся по отдельности, парами или в виде групп, хорошо выделяющихся на голубом фоне. Мазок имеет достаточную толщину и равномерен. На мазке отсутствуют включения кристаллов красителей. Фон полностью обесцвечен и имеет голубой цвет.

Состояние оборудования считается удовлетворительным:

- если в лаборатории имеется исправный, правильно настроенный бинокулярный микроскоп, уход за ним и его хранение соответствуют правилам;
- весы, применяемые для взвешивания, поверены в установленном порядке.

Соблюдение техники безопасности считается удовлетворительным, если помещения, где проводятся исследования, имеют гладкие стены, потолки и полы, покрытые неабсорбирующим, легко моющимся и дезинфицируемым материалом.

В помещении должны быть выделены четыре функциональные зоны:

- место для приема исследуемых образцов;
- место для подготовки и окраски мазков;
- место для микроскопии;
- место для заполнения лабораторного журнала и форм ответов.

Помещение должно быть оснащено эффективной вентиляцией (вытяжной вентилятор или работающий вытяжной шкаф), необходимо наличие раковины, водопровода и канализационной системы.

Сотрудники лаборатории должны иметь и правильно использовать защитные принадлежности и одежду, а именно: халат, передник, перчатки и маски, которые обеспечивают задержку более 95% частиц диаметром 1–5 мкм.

Сотрудники лаборатории соблюдают правила техники безопасности и применяют безопасные манипуляции при проведении исследования.

Характеристика организации выявления больных в данном медучреждении

Число обследованных

Является число обследованных удовлетворительным или нет – зависит от конкретной ситуации в данном регионе.

Если в районе с населением в 50 тысяч и заболеваемостью более 100 на 100 тысяч ежемесячно обследуется 30 человек и выявляется 4 бациллярных больных (эффективность 13%), нагрузку можно считать удовлетворительной. В таком же районе при эффективности микроскопии 5% обследование 30 человек может считаться неудовлетворительным показателем.

Вместе с тем, если при кратности 3 с целью диагностики в лаборатории обследовано за месяц 160 человек – нагрузка превышает 20 мазков в день на одного сотрудника, что является неудовлетворительным показателем для КДЛ ОЛС.

При любой эффективности обследование 12 человек в месяц, даже при трехкратном их обследовании, будет недостаточным – нагрузка лаборатории менее 10 мазков в неделю не может поддержать необходимый профессионализм сотрудников.

Эффективность микроскопии для новых случаев

Эффективность микроскопии зависит от качества работы лаборатории при наличии большого числа пропусков положительных мазков (ложноотрицательных мазков).

В случае если реанализ не выявляет значительного числа таких ошибок, эффективность зависит от правильности подбора пациентов для обследования их на наличие туберкулезной инфекции методом Циля–Нильсена.

При низкой эффективности повышаются затраты на выявление 1 бациллярного больного (сравните: при эффективности 10% для выявления 1 больного обследуются 10 подозреваемых на наличие туберкулезной инфекции, при эффективнос-

ти 1% – 100). При низкой эффективности повышение доли отрицательных мазков негативно сказывается на квалификации лаборантов.

Доля слюны в образцах (по журналу)

Доля слюны оценивается как по данным журнала, так и по данным реанализа. Высокая доля слюны (показатель превышает 10%) является результатом неконтролируемого сбора мокроты, плохой работы пунктов сбора мокроты и /или неправильного подбора пациентов для обследования на туберкулезную инфекцию.

Высокая доля слюны снижает эффективность и чувствительность исследования, повышает вероятность появления неудовлетворительных мазков и ошибок микроскопистов.

Кратность обследования

Кратность обследования менее 2,5 говорит о том, что имеется значительное количество случаев, когда для обследования пациентов методом микроскопии с целью диагностики туберкулеза исследовалось менее 3 образцов мокроты, то есть о неудовлетворительной организации обследования.

Поскольку в некоторых случаях положительной оказывается только вторая и/или третья проба мокроты, исследование менее 3 образцов может привести к недовыявлению бациллярных больных.

В нормативных документах Российской Федерации отсутствует понятие «кураторский визит» в отношении лабораторной службы, а применяется термин «инспекционный контроль», который не в полной мере соответствует понятию «курация»: он не включает такие функции куратора, как обучение сотрудников лаборатории и решение выявленных проблем.

В положении об аккредитации клиничко-диагностических лабораторий (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 295, 1993 год) предусматривается обследование аккредитуемой лаборатории на этапе принятия решения об аккредитации лаборатории и систематический инспекционный контроль лаборатории в период ее действия.

В рамках сертификации процессов выполнения клинических лабораторных исследований также планируется проведение инспекционных визитов.

Помимо оценки работы лаборатории при ее посещении проводится также оценка качества проводимых ею исследований путем выборочного повторного исследования мазков или предоставления лаборатории тест-наборов окрашенных или неокрашенных мазков, приготовленных централизованно.

Повторное исследование мазков

Пересмотр мазков в курирующей лаборатории осуществляется «слепым» методом, то есть положительные и отрицательные мазки располагаются в одном наборе, в порядке номеров, и референс-микроскопист не знает результатов оценки этих мазков в контролируемой лаборатории.

При проведении реанализа определяется правильность количественной оценки мазка, проводится оценка качества приготовления и окраски мазка, а также оцени-

вается диагностический материал, из которого приготовлен мазок (слюна или мокрота).

Качество работы контролируемой лаборатории считается неудовлетворительным, если среди мазков, подвергнутых проверке, обнаружено более 10% с неудовлетворительным окрашиванием или качеством приготовления мазка, ложноположительные мазки или более 5% ложноотрицательных мазков.

Если в перепроверенных отрицательных мазках обнаружен хотя бы 1 мазок, оцененный референс-микроскопистом на 1+ и более, качество работы лаборатории также считается неудовлетворительным.

При обнаружении при пересмотре мазков 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.

Панельное тестирование

При стабильной удовлетворительной работе лабораторий в регионе или для первичной оценки профессионального уровня лабораторных специалистов может применяться панельное тестирование.

В рамках Федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований (ФСВОК) с целью регулярной оценки качества исследований, проводимых в медицинских лабораториях, ежегодно проводится 2 цикла панельного тестирования с применением набора окрашенных и неокрашенных контрольных образцов с различным содержанием КУМ.

Результаты оценки контрольных мазков контролируемая лаборатория направляет в ФСВОК, где эти результаты оцениваются по совпадению с оценкой, данной соответствующим партиям контрольных мазков в экспертных лабораториях. Результаты оценки качества сообщаются в тестируемую лабораторию.

По результатам внешней оценки качества референс-лаборатории проводят обучение специалистов курируемых лабораторий по составленному плану обучения.

Вопросы

1. Перечислите, какие изменения в своей лаборатории вы сделаете, учитывая требования к правильной организации лабораторного исследования.
2. Как вы будете контролировать качество регистрации исследований?
3. Как вы будете контролировать качество окраски препаратов?
4. Как вы будете контролировать нагрузку лаборатории и стабильность ее работы?
5. О чем говорит показатель кратности обследования?
6. О чем говорит показатель эффективности микроскопии? От чего зависит эффективность?
7. Что может сделать лабораторный специалист для увеличения эффективности микроскопии?

Подписано к печати 5.02.2008 г.
Гарнитура Miniature. Печать офсетная. Бумага мелованная. Формат 60×90 1/8.
Усл. печ. л. 12,5. Тираж 2400 экз.

ООО «Издательство «Триада». ИД № 06059 от 16 октября 2001 г.
170034, г. Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 504, тел./факс: (4822) 42-90-22, 35-41-30. E-mail: triada@stels.tver.ru
<http://www.triada.tver.ru>

Заказ 248.
Отпечатано в филиале ОАО «ТОТ» Ржевская типография (г. Ржев, ул. Урицкого, д. 91)



