

ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

*Учебное пособие для проведения курсов обучения:
«Культуральные методы диагностики туберкулеза»,
«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

ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

**Учебное пособие для проведения курсов обучения:
«Культуральные методы диагностики туберкулеза»,
«Выявление туберкулеза методом микроскопии»**



УДК 616.002.5-078(078)
ББК 22.338я75
Л94

Настоящее учебное пособие подготовили:

- В.И. Гольшевская** доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела микробиологии ЦНИИТ РАМН
- О.В. Егорова** кандидат технических наук, член Нью-Йоркской академии наук, эксперт Госстандарта по оптическим приборам
- 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

Л94 **Люминесцентная микроскопия:** Учебное пособие для проведения курсов обучения: «Культуральные методы диагностики туберкулеза», «Выявление туберкулеза методом микроскопии». – М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. – 36 стр.
ISBN 978-5-94789-299-4

ББК 22.338я75

При подготовке учебного пособия использованы следующие руководства:

1. Приложение № 11 к Приказу МЗ РФ № 109 от 21.03.03 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».
2. Лабораторная служба в программах борьбы с туберкулезом. Часть II. Микроскопия. Всемирная организация здравоохранения, 1998.

Настоящее учебное пособие разработано по инициативе и при технической поддержке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), финансовой поддержке Агентства США по международному развитию (USAID) и издано при финансовой поддержке Фонда «Российское здравоохранение» в рамках программы «Развитие стратегии лечения населения, уязвимого к ВИЧ/СПИДу и туберкулезу» (донор – Глобальный фонд для борьбы со СПИДом, туберкулезом и малярией, IV раунд).

Подписано к печати 30.07.2008 г.
Гарнитура Miniature. Печать офсетная. Бумага мелованная. Формат 62×94 1/8.
Усл. печ. л. 4. Тираж 999 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>

Отпечатано в филиале ОАО «ТОТ» Ржевская типография (г. Ржев, ул. Урицкого, д. 91). Заказ № 1455.

© Коллектив авторов, 2008

© Оформление ООО «Издательство «Триада», 2008

ISBN 978-5-94789-299-4



Предисловие	4
Введение	5
1. Принцип метода люминесцентной микроскопии	
1.1. Общие понятия.....	7
1.2. Метод люминесцентной микроскопии для выявления КУМ	8
2. Приготовление препаратов для люминесцентной микроскопии	11
3. Окраска препаратов для люминесцентной микроскопии	
3.1. Оборудование и реактивы для окраски флуорохромными красителями.....	15
3.2. Метод окраски аураминол ОО и родамином С	15
3.3. Метод окраски аураминол О.....	17
4. Устройство люминесцентного микроскопа	20
5. Техника микроскопического исследования препаратов	
5.1. Оборудование и реактивы для проведения микроскопического исследования препаратов, окрашенных флуорохромными красителями	26
5.2. Порядок подготовки микроскопа и проведения микроскопического исследования препаратов	27
5.3. Учет результатов микроскопического исследования при окраске препаратов флуорохромными красителями	33
6. Хранение препаратов	36



Предисловие

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» были подготовлены комплекты учебных материалов, предназначенных для специалистов по лабораторной диагностике туберкулеза, проходящих обучение на курсах: «Выявление туберкулеза методом микроскопии» и «Культуральные методы диагностики туберкулеза».

Настоящее учебное пособие может быть использовано при проведении указанных курсов обучения в качестве приложения к базовым учебным пособиям: «Выявление туберкулеза методом микроскопии» и «Культуральные методы диагностики туберкулеза».

При проведении обучения для лабораторных специалистов, выполняющих в своих лабораториях исследования люминесцентным методом, в программу курса обучения включается раздел по люминесцентной микроскопии. В этом случае дополнительно к базовому учебному пособию используется также настоящее учебное пособие «Люминесцентная микроскопия».

Учебное пособие «Люминесцентная микроскопия» предназначено для обучения лабораторных специалистов (в первую очередь – врачей-бактериологов специализированных бактериологических лабораторий противотуберкулезных учреждений РФ) технологии проведения микроскопического исследования для диагностики кислотоустойчивых микобактерий методом люминесцентной микроскопии.

Учебное пособие «Люминесцентная микроскопия» включает в себя описание проведения процедур, связанных с люминесцентной микроскопией для выявления кислотоустойчивых микобактерий, в том числе детальное описание принципов работы, устройства и ухода за люминесцентным микроскопом.

Учебные материалы по организации исследований, безопасности проведения исследований, сбору, хранению, транспортировке материала, обеспечению качества исследований приводятся в соответствующих разделах базовых модулей.

Разработчики учебного пособия выражают глубокую благодарность специалистам ВОЗ за оказанную помощь и техническую поддержку в подготовке учебного пособия.

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



На практике используются два метода микроскопического исследования диагностического материала с целью выявления кислотоустойчивых микобактерий (КУМ):

- **метод прямой микроскопии**, когда мазок приготавливается непосредственно из необработанного (нативного) диагностического материала или его осадка (в случае жидкого материала);
- **метод микроскопии мазка из обработанного осадка материала**, подготовленного для культурального исследования путем обработки разжижающими и деконтаминирующими средствами и последующего центрифугирования при 3000 g в безопасной центрифуге (такие возможности, как правило, имеются только в специализированных бактериологических лабораториях).

Первый, наименее затратный метод широко применяется в тех лабораториях, в которых производится только микроскопия мазков с окраской препаратов по методу Циля–Нильсена и исследованием их в обычном световом микроскопе проходящего света (клинико-диагностические лаборатории общей лечебной сети). Окраска мазков люминесцентным методом чаще всего используется в бактериологических лабораториях специализированных противотуберкулезных учреждений и является альтернативой унифицированному методу окраски по Цилю–Нильсену.

Метод люминесцентной микроскопии для выявления кислотоустойчивых микобактерий, так же как и метод Циля–Нильсена, основан на проникновении в клетку карболового производного флуоресцентного красителя аурамина 0. Производное аурамина имеет ряд преимуществ перед карболовым фуксином при селективной окраске микобактерий: по-видимому, аурамин более прочно, чем фуксин, связывается с клеточными структурами микобактерий, обеспечивая яркое люминесцентное свечение окрашенной флуоресцентным красителем микобактериальной клетки, что позволяет обнаружить ее при меньшем увеличении микроскопа. Поэтому при просмотре одного и того же количества полей в случае люминесцентной микроскопии при использовании увеличения в пределах 200×–630× фактическая площадь просмотренного мазка приблизительно в 2,5–25 раз больше, чем при увеличении 1000×, применяемом при обычной микроскопии проходящего света. Это приводит к большему количеству находок при меньшей затрате времени. По литературным данным, люминесцентная микроскопия для выявления КУМ более эффективна, чем обычная микроскопия проходящего света.

Эффективность люминесцентной микроскопии во многом зависит от правильного выполнения процедуры окрашивания и наладки микроскопа. *Качественная и эффективная окраска флуорохромными красителями требует обязательного соблюдения кислотности (рН) мазка, а также освобождения микобактерий от окружающей их слизи, которая препятствует проникновению красителя в микробную клетку.* Несоблюдение этих условий приводит к снижению эффективности люминесцентной микроскопии и получению ложноотрицательных результатов исследования. Поэтому окраску люминесцентными красителями рекомендуется применять при исследовании мазков, приготовленных из осадка материала, обработанного для культурального исследования и нейтрализованного после деконтаминации. В связи с этим дан-



ный метод обычно используется только в бактериологических лабораториях, которые помимо микроскопического выполняют еще и культуральное исследование, при этом мазок и посев производятся параллельно и обязательно из одной и той же порции материала.

Вопросы

1. Перечислите основные методы микроскопического исследования, проводимого с целью выявления КУМ. В каких случаях они применяются?
2. Почему люминесцентную микроскопию не рекомендуется применять для исследования мазков из нативной мокроты?

1.1. Общие понятия

Люминесценция – это способность вещества испускать излучение при воздействии на него внешней энергии (энергии возбуждения).

Излучение люминесценции – это избыток излучения, превышающий тепловое излучение вещества, которое возникает при данной температуре. Длительность излучения люминесценции значительно превышает период световых волн.

Излучение люминесценции зависит от природы вещества (объекта) и характеризуется:

- **спектральным распределением плотности лучистого потока**, т. е. шириной спектральной полосы пропускания, величинами коэффициента излучения и максимальной длиной волны, при которой происходит излучение;
- **выходом люминесценции**, т. е. отношением излучаемой энергии к поглощенной, на который влияет степень тушения излучения, зависящая от структуры вещества и от внешних условий;
- **временем затухания**.

Фотолюминесценция – это свечение объектов, возникающее в результате поглощенной ими лучистой энергии. Вследствие некоторых причин свет люминесценции обладает большей длиной волны, чем поглощенный (правило Стокса). Поэтому люминесценцию выгодно возбуждать либо ультрафиолетовыми лучами (300–400 нм), либо сине-фиолетовыми.

В обоих случаях возникает свечение в цветовой гамме всего или большей части видимого спектра. Спектр флуоресценции остается неизменным при любой длине волны возбуждающего излучения.

Этот вид люминесценции носит название наведенной (вторичной) в отличие от первичной – собственной флуоресценции, нередко проявляемой витаминами, многими пигментами, некоторыми жировыми веществами и антибиотиками, встречающимися в живых организмах, некоторыми продуктами нормального и патологического обмена.

Фотолюминесценцию условно подразделяют на:

- **флуоресценцию**, то есть свечение со временем затухания, не превышающим 10^{-8} секунд;
- **фосфоресценцию**, которая продолжается более длительное время после прекращения возбуждения.

Флуорохромы – красители, не вызывающие сильной окраски объектов в обычном свете, но флуоресцирующие при облучении ультрафиолетовыми лучами. Из синтетических флуорохромов наилучшие результаты дают акридин оранжевый, корифосфин, примулин, родамин, ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианат), которые обычно применяют в виде слабых водных растворов.

Для выявления кислотоустойчивых микобактерий применяют метод люминесцентной микроскопии, называемый флуорохромированием. **Метод флуорохромирования** почти не отли-

Объект поглощает	Объект светится
синий свет	зеленый свет
зеленый свет	желтый свет
желтый свет	красно-оранжевый свет

чается от общеизвестных методов окрашивания анилиновыми красителями, хотя и требует обычно меньшего времени (доли минуты).

Для люминесцентных методов исследования большую роль играет обработка препарата специальными реактивами – флуорохромами. Отдельные молекулы вещества обладают способностью на короткое время поглощать свет, а затем испускать его в другой длине волны, как правило, сдвинутой в сторону красного света (закон Стокса¹), превышая длину волны поглощаемого света возбуждения на 20–50 нм.

Различные флуорохромы (маркеры) обладают в зависимости от вида совершенно определенными спектрами поглощения, зависящими от внутреннего строения флуоресцирующих молекул, а иногда и от их окружения. Поглощается не каждый фотон облучающего света, а лишь некоторая их часть. Кроме того, не все захваченные фотоны снова излучают свет. Хорошие маркирующие вещества имеют высокий «квантовый выход», характеризующий соотношение между испущенными и поглощенными фотонами. Этот эффект является очень полезным для микроскопии. Маркированный таким образом препарат освещается возбуждающим выделенным, например, синим светом и наблюдается уже в свете, сформированном с помощью запирающего светофильтра, не пропускающего полностью, например, длинноволновый зеленый, желтый и красный свет. В случае, когда объект не окрашен специальными красителями, ультрафиолетовый свет, проходя через объектив и попадая на препарат, по-

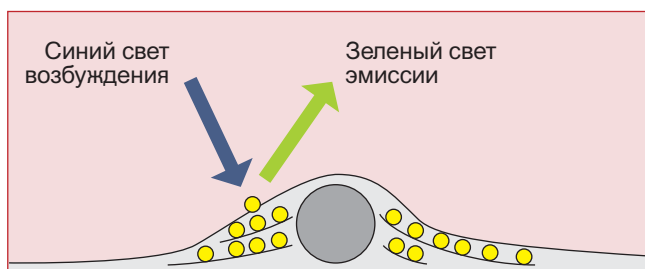


Рис. 1 Схема свечения маркеров

глощается молекулярными структурами объекта и остается невидимым или почти невидимым для человеческого глаза. Таким образом, маркированные структуры, например – части клеточной структуры, высвечиваются зеленым светом на темном фоне (рис. 1).

Люминесцентная микроскопия. Метод основан на наблюдении светящихся микроскопических объектов на

общем темном фоне препарата. По сравнению с методом световой микроскопии в проходящем свете он обладает рядом преимуществ: высокая степень контрастности цветных светящихся объектов на темном фоне, значительно большая площадь просматриваемого поля зрения за счет использования меньших увеличений микроскопа, экономия времени и др.

1.2. Метод люминесцентной микроскопии для выявления КУМ

При обработке диагностического материала препарата люминесцентными красителями (карболовое производное флуоресцентного красителя аурамина 0 и др.), которые связываются с воскоподобными структурами микробной клетки и проника-

¹ **Правило Стокса (закон Стокса)** установлено Дж. Г. Стоксом в 1852 г. Правило утверждает, что длина волны фотолюминесценции больше, чем длина волны возбуждающего света. Согласно этому энергия фотонов люминесценции меньше энергии фотонов возбуждающего света. Правило Стокса выполняется не всегда, во многих случаях в спектре фотолюминесценции наблюдаются антистоксовы линии, длины волн которых короче возбуждающей. Правило широко известно в формулировке немецкого физика Э. Ломмеля: максимум спектра люминесценции сдвинут по отношению к максимуму спектра поглощения в сторону более длинных волн.

ют в ее цитоплазму, последующее облучение препарата возбуждающим источником света (определенный спектр ультрафиолетового излучения) вызывает оранжевое или ярко-желтое свечение окрашенных клеток микобактерий на черном или темно-зеленом фоне.

Указанная цветовая маркировка объекта на темном фоне способствует более быстрому распознаванию объекта. В связи с этим окрашенные флуорохромными красителями препараты обычно исследуются при увеличении в пределах 200×–630×, тогда как окрашенные фуксином – при увеличении 800×–1000×. Разница в увеличении позволяет микроскописту видеть в люминесцентном микроскопе поле зрения большего диаметра, чем в обычном микроскопе, и, соответственно, просматривать большую площадь мазка в одном поле зрения. Например, по сравнению с увеличением 1000×, при использовании увеличения 400×, линейное поле на предмете (диаметр поля зрения мазка) увеличивается с 0,18 до 0,45 мм, то есть в 2,5 раза, а площадь просматриваемого поля зрения возрастает в 6,36 раза – с 0,025 до 0,159 мм² (табл. 1).

Указанная особенность люминесцентной микроскопии существенно сокращает время, необходимое для просмотра мазка. Подсчитано, что, если микроскопическое исследование необходимой площади мазка при окраске по Цилю–Нильсену составляет приблизительно 10–15 минут, то для исследования той же площади мазка методом люминесцентной микроскопии потребуется только 2–3 минуты (табл. 1).

Таблица 1

Сравнение времени, затраченного на просмотр отрицательных мазков с применением люминесцентного и обычного микроскопа проходящего света

Условия	Люминесцентная микроскопия	Микроскопия проходящего света
Увеличение	400× объектив 40×, окуляр 10×/18	1000× объектив 100×, окуляр 10×/18
Линейное поле на предмете (диаметр поля зрения мазка), мм	0,45	0,18
Площадь одного поля зрения мазка, мм ²	0,159	0,025
Количество просматриваемых полей зрения	50	300
Общая площадь просмотренного мазка (по количеству полей), мм ²	7,95	7,50
Условное время просмотра одного поля зрения*, с	3	3
Время, затраченное на просмотр одного мазка*, мин	2,5	15

* Затраченное время может меняться в зависимости от типа микроскопа, а также условий конкретной лаборатории.

Наряду с этим при люминесцентной микроскопии отмечается значительно большая резкость и контрастность микроскопической картины, что повышает комфортность микроскопического исследования. Для глаза исследователя намного лег-

че обнаружить флуоресцирующие оранжевые или ярко-желтые микобактерии на темном (при гашении фона метиленовым синим или перманганатом калия) или темно-красном (при гашении фона акридиновым оранжевым) фоне, чем выявить красные микобактерии на ярко-голубом фоне клеточного детрита при окраске по Цилю–Нильсену. Это делает метод люминесцентной микроскопии особенно ценным при исследовании олигобациллярного материала. Чувствительность люминесцентной микроскопии, особенно в сочетании с методом обогащения диагностического материала (микроскопия осадка), приближается к чувствительности метода посева.

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

Однако необходимо учитывать, что при люминесцентной микроскопии существует вероятность получения ложноположительных результатов. При этом использование для люминесцентной микроскопии объектива с меньшим увеличением (по сравнению с обычным микроскопом проходящего света) не оказывает существенного влияния на возможность получения ложноположительных результатов. Гораздо большее значение имеет сочетание запирающих и возбуждающих светофильтров, то есть цвет свечения, а также наличие или отсутствие фонового свечения, которые влияют на общий цвет свечения, что и может явиться основной проблемой.

Поэтому во всех сомнительных случаях микроскопической картины для контроля следует использовать микроскопию мазка, окрашенного повторно по методу Циля–Нильсена.

Вопросы

1. Опишите принцип метода люминесцентной микроскопии.
2. Каковы преимущества люминесцентной микроскопии по сравнению с обычной микроскопией?

Приготовление препаратов для люминесцентной микроскопии

2

Мазки для люминесцентной микроскопии рекомендуется готовить из осадка диагностического материала, полученного после проведения специальной обработки материала с последующим центрифугированием при 3000 g в антиаэрозольной рефрижераторной центрифуге.

Методика обработки материала и подготовки осадка изложена в базовом учебном пособии «*Культуральные методы диагностики туберкулеза*».

Перед нанесением материала осадка на предметное стекло необходимо проверить уровень pH осадка материала и добиться его нейтрального значения pH (6,8–7,0). Уровень pH определяют с помощью бумажной индикаторной полоски. При щелочной реакции отобранного для приготовления мазка материала ($pH > 7,0$) к нему следует добавить 1–2 капли 10% раствора соляной кислоты; при кислой реакции ($pH < 6,8$) – столько же 6% раствора едкого натра. После добавления нейтрализующего раствора необходимо тщательно перемешать осадок. Затем с помощью бумажной индикаторной полоски определить уровень pH . После получения оптимального уровня pH (6,8–7,0) осадок может быть использован для приготовления мазка.

Эта особенность приготовления мазка ограничивает широкое использование люминесцентной микроскопии для исследования нативного материала.

Процедура подготовки предметных стекол для исследования подробно описана в базовом учебном пособии «*Выявление туберкулеза методом микроскопии*».

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

Не следует касаться чистой поверхности стекла руками или перчатками!

Приготовление мазка из осадка диагностического материала, подготовленного для культурального исследования

Культуральное исследование любого диагностического материала обязательно сопровождается параллельным микроскопическим исследованием осадка, полученного после обработки (деконтаминации и разжижения) материала с последующим центрифугированием и нейтрализацией.

Перед началом забора диагностического материала в пипетку (для выполнения процедуры посева и приготовления мазка) следует убедиться в том, что номер пробирки с диагностическим материалом соответствует номерам пробирок с питательной средой и номеру предметного стекла для приготовления мазка (рис. 2).

Все мазки из осадка приготавливают после выполнения процедуры посева!



Рис. 2 Сверка номеров на пробирках с диагностическим материалом и предметных стеклах

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

Последовательность процедуры приготовления мазка из осадка обработанного материала:

- Оставшийся после посева осадок встряхивают, забирают в пипетку.
- 1–2 капли осадка наносят на предметное стекло, формируя мазок размером 2×1 см (рис. 3).

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

Таким образом, мазок из осадка должен располагаться в центре предметного стекла, занимая площадь не менее 2×1 см. Такая площадь мазка вполне достаточна для проведения эффективного микроскопического исследования и в то же время значительно повышает безопасность манипуляции приготовления мазка, его окраски и последующей микроскопии, так как периферические части и ребра предметного стекла остаются не загрязненными инфекционным материалом. При этом микроскопист, исследующий от 100 до 300 полей зрения, в зависимости от применяемого увеличения просматривает от 1 до 4% площади такого мазка. Это вполне достаточно для обнаружения диагностически значимого количества микобактериальных клеток.

При приготовлении мазка для микроскопического исследования необходимо добиваться оптимальной его толщины.



Приготовление мазка из осадка диагностического материала **Рис. 3**

Если мазок слишком тонкий и содержит мало материала, при микроскопическом исследовании можно получить ложноотрицательный результат.

Если мазок слишком толстый, это затрудняет его фиксацию, материал недостаточно плотно прикрепляется к стеклу и может соскользнуть с него при многократных процедурах смены рабочих растворов и воды. Кроме того, толстый мазок труднее поддается обесцвечиванию, а в дальнейшем – плохо просматривается при микроскопическом исследовании.

Через правильно приготовленный мазок можно читать газетный шрифт, расположенный позади стекла на расстоянии 5–10 см (рис. 4).



Оценка толщины приготовленного из осадка мазка: **Рис. 4**
▪ слева – слишком толстый мазок (текст практически не виден);
▪ в центре – правильно приготовленный мазок (текст виден);
▪ справа – слишком тонкий мазок

Приготовленные вышеуказанным способом мазки помещают на 15–30 минут на лотки (подносы), выстланные фильтровальной бумагой, и высушивают при комнатной температуре в биологическом шкафу безопасности или в вытяжном шкафу.

Приготовление мазка из осадка необработанного жидкого материала

Мазки для окрашивания флуоресцентными красителями могут быть приготовлены из полученного после центрифугирования осадка любого жидкого необработанного диагностического материала (бронхоальвеолярные смывы, промывные воды бронхов или желудка, моча, пунктаты из закрытых полостей, экссудаты и др., при условии, что эти жидкости не сворачиваются). Осадок представляет собой обогащенную фракцию диагностического материала и значительно чаще позволяет получить положительные результаты.

Особенностью существования *M. tuberculosis* в жидкостях является способность микобактерий долгое время находиться во взвешенном состоянии. В связи с этим рекомендуется производить центрифугирование при *3000 g в течение 20 минут*.

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

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

Фиксация мазка

При использовании флуорохромных красителей фиксировать мазки над пламенем горелки не рекомендуется.

Рекомендуется фиксация мазков в сухожаровом шкафу при 80 °С в течение 1 часа с момента достижения указанного режима или при 65–75 °С в течение не менее 2 часов.

Высушенные и фиксированные мазки не подлежат длительному хранению и должны сразу же окрашиваться.

Вопросы

1. Опишите методику приготовления мазка из осадка обработанного для культурального исследования диагностического материала.
2. Как следует оценивать правильность приготовления мазка? Почему при приготовлении мазка очень важно добиться его оптимальной толщины?
3. Как Вы будете фиксировать мазки, приготовленные для окраски флуорохромными красителями?

Окраска препаратов для люминесцентной микроскопии

3.1. Оборудование и реактивы для окраски флуорохромными красителями

Для окраски препаратов флуорохромными красителями необходимо следующее:

- раковина или специальный вместительный лоток для проведения окраски;
- специальный штатив («рельсы») для окраски мазков на предметных стеклах;
- пинцет или щипцы для взятия предметных стекол;
- раствор люминесцентных красителей для окраски кислотоустойчивых микобактерий;
- спиртовой раствор соляной кислоты для обесцвечивания мазков после окраски аураминем и родамином;
- раствор для гашения фона обесцвеченного мазка;
- емкость с дистиллированной водой для промывания мазков;
- штатив для просушивания окрашенных стекол на воздухе в вертикальном или наклонном положении;
- емкость с дезинфицирующим раствором.

Существует несколько методов окраски микобактерий люминесцентными красителями. В нашей стране наибольшее распространение получили два метода, которые описаны ниже.

3.2. Метод окраски аураминем ОО и родамином С

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

Реактивы

- Спирт этиловый марки ОП-2, ТУ 6-09-45-12-77 – регистрационное удостоверение 74/614/11
- Кислота соляная концентрированная, ГОСТ 3118-77
- Метиленовый синий хлорид, ТУ 6-09945-75
- Аурамин ОО, *Auramine O*, *Sigma* (№ А9655)
- Родамин С, *Rhodamine B*, *Sigma* (№ R6626)
- Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72

Приготовление растворов

Раствор 1. Раствор аурамина ОО – родамина С

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

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

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

Раствор 2. Обесцвечивающий раствор

Этиловый спирт 96° 97,0 мл

Концентрированная соляная кислота 3,0 мл

Аккуратно добавить 3 мл концентрированной соляной кислоты к 97 мл этилового спирта.

Всегда осторожно вливайте кислоту в спирт, но не наоборот!

Раствор 3. Гаситель фона

Метиленовый синий хлорид 250,0 мг

Вода дистиллированная 100,0 мл

В 100 мл дистиллированной воды растворить 250 мг метиленового синего хлорида.

Хранение растворов

Все приготовленные растворы должны быть профильтрованы через бумажный фильтр и помещены в герметически закрытые емкости из темного стекла. На каждой емкости должна быть надпись, содержащая:

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

Растворы хранят при комнатной температуре, в темном месте, в течение 3 месяцев, следя за тем, чтобы не образовывался осадок.

Процедура окраски

Не нагревать мазки и не использовать полоски фильтровальной бумаги!

1. Стекла с фиксированными мазками разложить на специальные штативы («рельсы») для окраски так, чтобы они не касались друг друга и расстояние между их боковыми краями составляло примерно 1 см.
2. Мазки залить **раствором 1** на **1 час**.
3. Тщательно, но аккуратно промыть дистиллированной водой каждое стекло до тех пор, пока не смоются все остатки краски.
4. Обесцветить **раствором 2** (3% солянокислый спирт) в течение **3 минут**.
5. Промыть дистиллированной водой.
6. Гашение фона произвести **раствором 3** в течение **60 секунд**.
7. Аккуратно промыть препарат дистиллированной водой; если препарат имеет интенсивную синюю окраску, можно повторно очень аккуратно промыть его.
8. Препараты высушивают при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.

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

При приготовлении и окраске мазков люминесцентными красителями необходимо:

- не делать толстых мазков, так как это затрудняет фиксацию мазка на стекле и последующее обесцвечивание мазка;
- избегать неполного обесцвечивания фона мазка, поскольку КУМ практически не обесцвечиваются.

Микроскопию производят по возможности сразу же после окончания процедуры окраски люминесцентными красителями и высыхания препаратов. В случае невозможности проведения немедленной микроскопии окрашенные препараты рекомендуется сохранять в прохладном месте, прикрыв штатив с препаратами черной бумагой. Хранение предназначенных для исследования окрашенных препаратов в месте, доступном прямым солнечным лучам или ультрафиолетовому свету, может привести к получению ложноотрицательных результатов.

В препарате, окрашенном флуорохромными красителями (аурамин О, родамин С и др.), микробные клетки начинают светиться оранжевым или ярко-желтым светом и становятся видными в виде палочковидных структур на черном или темно-зеленом фоне препарата.

В том случае, если при микроскопии мазков обнаруживается, что фон мазка имеет желтоватый оттенок, – это означает, что мазки не были достаточно хорошо обесцвечены. В этом случае необходимо провести дополнительное повторное обесцвечивание приготовленных мазков, а в дальнейшем – увеличивать время экспозиции с раствором солянокислого спирта примерно вдвое.

Рекомендуется не передерживать мазки в метиленовом синем во избежание ослабления свечения и возникающих затруднений в процессе микроскопирования.

Мазки, которые использовались для флуоресцентной микроскопии, в случае сомнений в истинности феномена кислотоустойчивости можно повторно окрасить по методу Циля–Нильсена для подтверждения кислотоустойчивости выявленных в препарате микроорганизмов.

3.3. Метод окраски аураминем О (Hagemann P.K., 1938; CDC, 1985; ВОЗ, 1998)

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

Реактивы

- Спирт этиловый марки ОП-2, ТУ 6-09-45-12-77, 96°
- Кислота соляная концентрированная, ГОСТ 3118-77
- Фенол кристаллический (карболовая кислота), ГОСТ 6417-72
- Аурамин ОО, *Auramine O*, *Sigma* (№ А9655)
- Акридиновый оранжевый, *Acridine orange*, *Sigma* (№ А6014)
- Перманганат калия, ГОСТ 10163-76
- Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72
- Безводный двухзамещенный фосфат натрия, ГОСТ 4172-66

Приготовление растворов

Раствор 1. Спиртовой раствор аурамина О

Аурамин 0,1 г
Этиловый спирт 96° 10,0 мл
Растворить аурамин в спирте.

Раствор 2. Раствор фенола

Фенол кристаллический 3,0 г
Дистиллированная вода 87,0 мл

Расплавить 3 г кристаллического фенола путем легкого подогревания на водяной бане (температура плавления фенола 41°C). Затем добавить слегка подогретую дистиллированную воду до общего объема 90 мл.

Раствор 3. Рабочий раствор аурамина

Смешать растворы 1 и 2 и перелить в плотно закрывающуюся емкость из темного стекла.

Раствор 4. Обесцвечивающий раствор

Концентрированная соляная кислота 0,5 мл
Технический 70° этиловый спирт 100,0 мл
Аккуратно добавить концентрированную соляную кислоту к спирту.
Всегда осторожно вливайте кислоту в спирт, но не наоборот!

Раствор 5. Гаситель фона

Для этих целей можно использовать растворы перманганата калия или акридинового оранжевого.

Раствор перманганата калия:

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

Растворить перманганат калия в дистиллированной воде и перелить в плотно закрывающуюся бутылку из темного стекла.

Раствор акридинового оранжевого:

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

Растворить фосфат натрия в дистиллированной воде. Добавить акридиновый оранжевый. Хранить в плотно закрывающейся темной емкости.

Хранение растворов

Все приготовленные растворы должны быть профильтрованы через бумажный фильтр и помещены в герметически закрытые емкости из темного стекла. На каждой емкости должна быть надпись, содержащая:

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

Растворы хранят при комнатной температуре, в темном месте, в течение 3 месяцев, следя за тем, чтобы не образовывался преципитат.

Процедура окраски

Не нагревать мазки и не использовать полоски фильтровальной бумаги!

1. Стекла с фиксированными мазками разложить на специальные штативы («рельсы») для окраски так, чтобы они не касались друг друга и расстояние между их боковыми краями составляло примерно 1 см.
2. Мазки залить **раствором 3** на **15 минут**.
3. Тщательно, но аккуратно промыть мазки дистиллированной водой.
4. Обесцветить **раствором 4** (0,5% солянокислый спирт) в течение **2 минут**.
5. Промыть дистиллированной водой каждое стекло до тех пор, пока не смоются все остатки краски.
6. Гашение фона произвести **раствором 5 (5а – раствор перманганата калия или 5б – раствор акридинового оранжевого)** в течение **2 минут**.
7. Аккуратно промыть препарат дистиллированной водой.
8. Препараты высушивают при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.

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

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

Микроскопию производят по возможности сразу же после окончания процедуры окраски люминесцентными красителями и высыхания препаратов. В случае невозможности проведения немедленной микроскопии окрашенные препараты рекомендуется сохранять в прохладном месте, прикрыв штатив с препаратами черной бумагой. Хранение предназначенных для исследования окрашенных препаратов в месте, доступном прямым солнечным лучам или ультрафиолетовому свету, может привести к получению ложноотрицательных результатов.

Вопросы

1. Почему для промывания мазков в процессе окраски флуорохромными красителями используют только дистиллированную воду?
2. В каких условиях рекомендуется сохранять окрашенные препараты до проведения процедуры микроскопического исследования?
3. Что Вы предпримете, если при микроскопическом исследовании препаратов обнаруживается, что фон просматриваемого мазка имеет желтоватый оттенок?
4. Что следует предпринять для контроля (подтверждения) результатов исследования в случае получения методом люминесцентной микроскопии сомнительной микроскопической картины?

4 Устройство люминесцентного микроскопа

Люминесцентные микроскопы делятся по группам сложности.

В зависимости от группы сложности в микроскопе изменяются основные модули:

- источник света становится мощнее;
- линейные поля окуляров увеличиваются;
- усложняется конструкция устройства установки и управления светофильтрами;
- переход от ручного к автоматическому режиму управления;
- увеличивается количество устанавливаемых люминесцентных блоков светофильтров.

Конструкция люминесцентного микроскопа отличается от биологического микроскопа (проходящего света) наличием осветителя отраженного света (рис. 5).

Осветитель (1–4) расположен над объективами (7). Кроме того, имеются дополнительные узлы в виде специальных блоков со светофильтрами (5, 9) и светоделительной полупрозрачной пластинкой (дихроичным зеркалом) (6), которые расположены между осветителем отраженного света и объективами (рис. 6).

Люминесцентный осветитель отраженного света включает в себя:

- узел крепления источника света (1), который обеспечивает установку ртутной лампы (в отечественных микроскопах – ДРШ-250, ДРШ-250-3, ДРШ100, НВО 100 W/2, в зарубежных – НВО 50 W, НВО 100 W, НВО 150 W) или ксеноновой лампы, а также увеличение светящегося тела за счет применения специального сферического зеркала-отражателя;
- коллектор, который может быть неподвижным или подвижным с узлом фокусировочного перемещения вдоль оптической оси и шторка для перекрытия света;

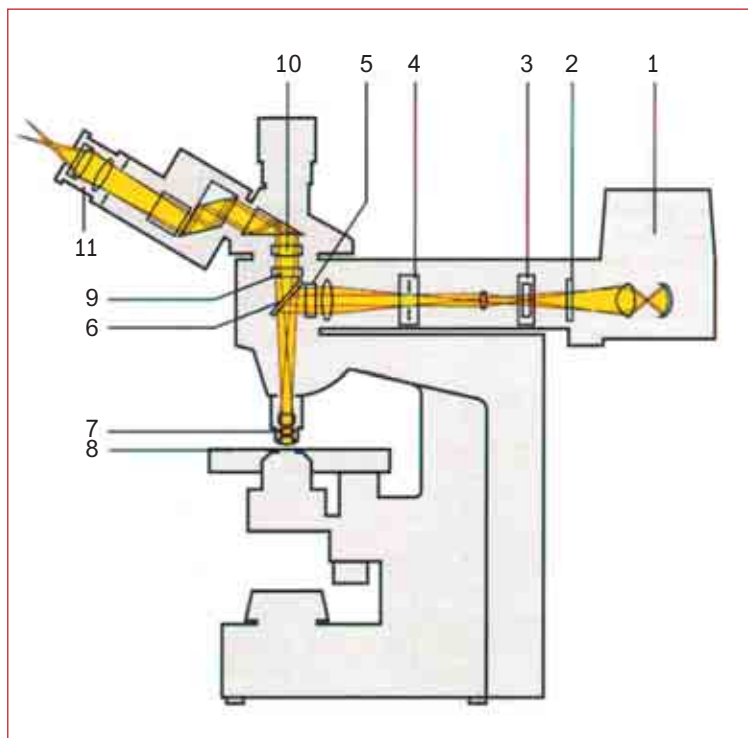


Рис. 5 Конструкция люминесцентного микроскопа

и шторка для перекрытия света;

- блок поджига ртутной (или ксеноновой) лампы;
- осветитель отраженного света с узлами полевой и апертурной диафрагм;
- устройство крепления блока люминесцентных светофильтров.

В качестве источника света могут применяться галогенные и диодные лампы (например, в простых накладных осветителях типа отечественного ОИ 28).

Однако галогенные лампы в качестве источников света не пригодны для большей час-

ти люминесцентных исследований из-за того, что металлическая нить накаливания преобразует большую часть потребленной электроэнергии в красный или невидимый инфракрасный свет. При этом лампа имеет непрерывный спектр излучения в широком спектральном диапазоне, который не всегда пригоден для возбуждения и наблюдения, особенно слабосветящихся объектов. Для работы в свете люминесценции необходимо иметь источник света с линейчатым спектром, интенсивным в коротковолновой части, в той части, которая наиболее приемлема для биологических объектов.

Ртутные лампы работают по принципу газового разряда и обладают дискретным спектром излучения (рис. 7).

Лампы имеют специфичное светящееся тело. В кварцевую колбу вплавлены два электрода. В зоне горения содержится небольшое количество ртути. За счет разрядов определенной мощности высокого напряжения между электродами возникает электрическая световая дуга, которая и поддерживается в «горящем» состоянии.

Лампа излучает чрезвычайно интенсивный свет, содержащий значительную долю УФ-излучения. Излучаемая световая энергия концентрируется при определенных длинах волн, так называемых «линиях ртути».

Большим преимуществом таких линейчатых излучателей является чередование интенсивных линий и малоинтенсивных спектральных полос, которые необходимы при создании условий для наблюдения в свете люминесценции. Важно, что возбуждение флуоресцирующих меток осуществляется в «линии» с определенной длиной волны, а их свечение, в силу смещения Стокса, наблюдается при другой длине волны, смещенной в более длинноволновую часть спектра.

Как ни при каком другом методе исследования, наблюдение в свете люминесценции требует серьезного отношения: от научно-теоретичес-

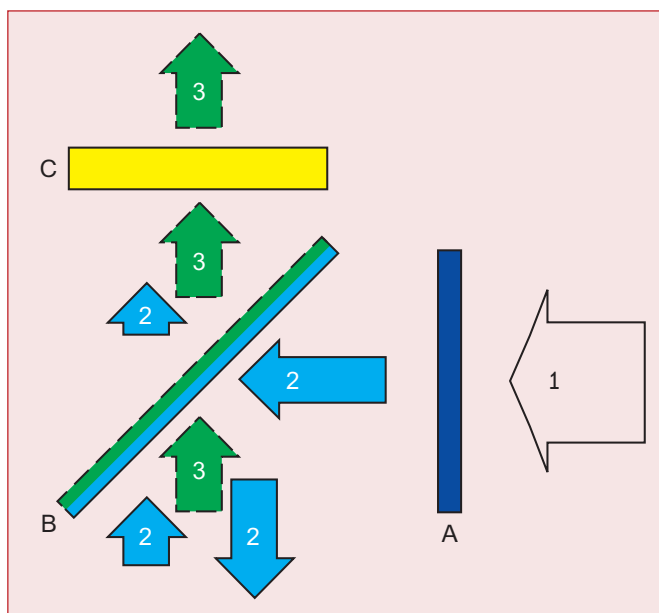
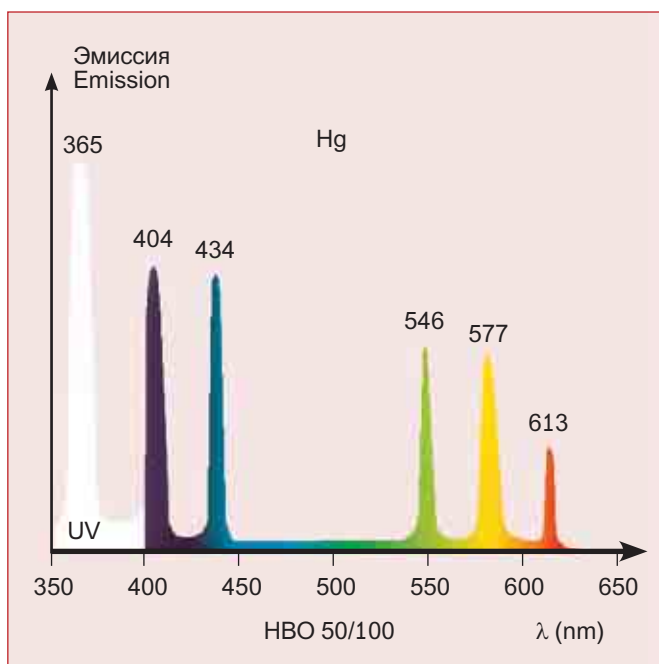


Рис. 6



Спектр ртутной лампы Рис. 7

кого обоснования до технологии, подготовки, проведения и собственно процесса наблюдения и анализа.

Правильность представления об объекте в значительной степени зависит от качества и состояния микроскопа.

На качество люминесцентного изображения влияют:

- класс микроскопа и тип оптической коррекции объективов;
- мощность источника света;
- правильность подбора флуорохромов и системы запирающих и возбуждающих светофильтров;
- настройка осветительной системы микроскопа.

На рис. 8 и 9 представлены результаты экспериментов по влиянию различных факторов на люминесцентное изображение.

Для исключения влияния неправильной настройки осветительной системы только в люминесцентном осветителе современного микроскопа устанавливаются специальные контрольные окна (рис. 10), которые встроены и вводятся в ход лучей, а при работе выводятся из него.

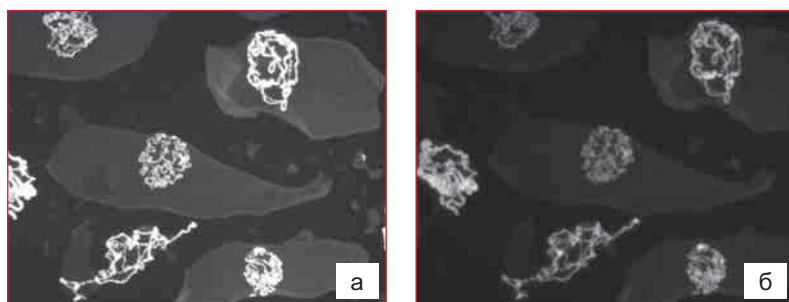


Рис. 8 Влияние типа оптической коррекции на качество люминесцентного свечения: а – объектив Achromat, 10×; б – объектив Achromat, 10×. Наблюдается снижение яркости свечения объекта при одинаковом общем качестве изображения и точности воспроизведения

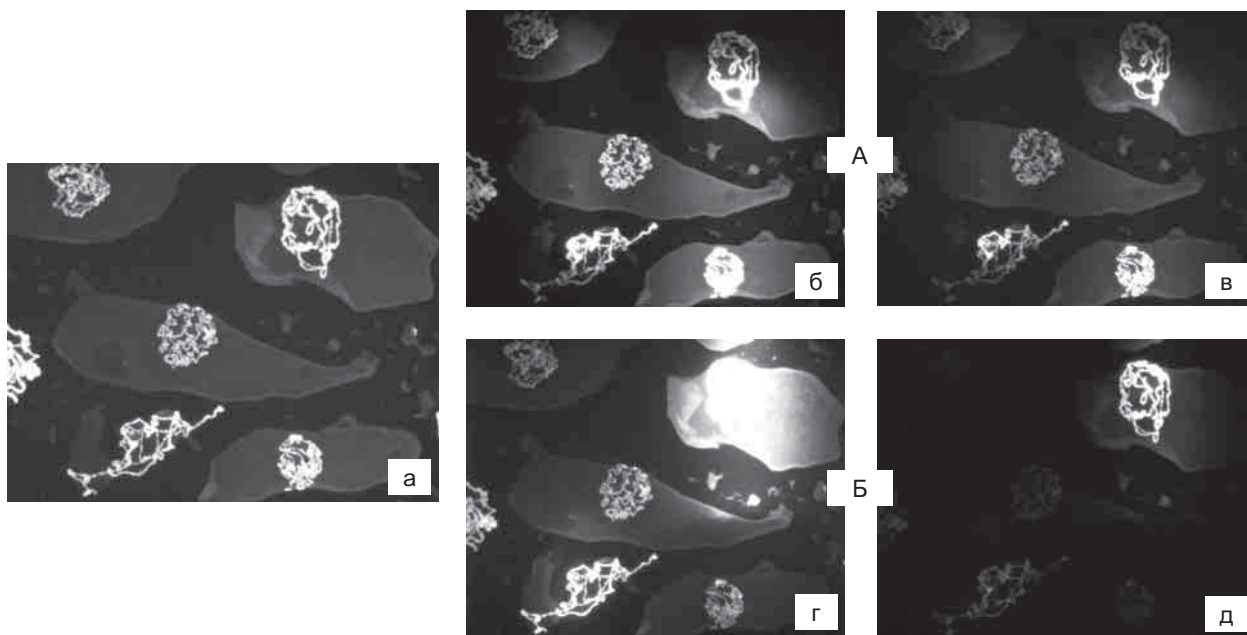


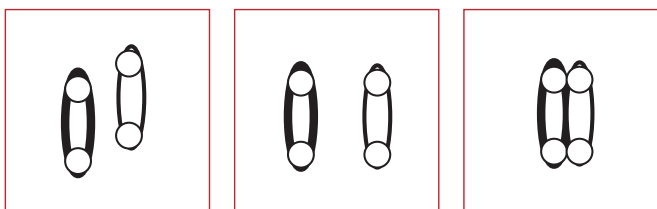
Рис. 9 Влияние настройки люминесцентного осветителя на свечение изображения: а – нормальная настройка осветителя; А – изменение положения коллектора; б – крайнее левое положение; в – крайнее правое положение; Б – децентрировка светящегося тела; г – крайнее левое положение; д – крайнее правое положение. Наблюдается исчезновение и снижение яркости светящихся элементов; появление артефактов

Настройка люминесцентного осветителя происходит следующим образом:

- из револьверного устройства вывинтить объектив;
- на предметный стол положить лист белой бумаги;
- ввести блок светофильтров;
- опустить светозащитный экран;
- включить блок поджига лампы; дать ей разгореться в течение 10 минут;
- наблюдать светящийся диск, в котором видны два изображения – собственно светящееся тело между электродами и его зеркальное изображение; задача – совместить эти изображения в центре диска;
- с помощью коллектора получить резкое изображение первичного изображения светящегося тела;
- произвести настройку в соответствии с рис. 11;
- проконтролировать положение сдвоенного изображения с помощью контрольного окна, для чего ввести его в ход лучей – изображение должно быть в центре контрольного круга;
- установить объект;
- ввинтить объектив.



Контрольное окно в люминесцентном осветителе отраженного света **Рис. 10**



Настройка с помощью центровочных винтов в узле крепления лампы: а – два изображения децентрированы друг относительно друга; б – изображения вывести параллельно друг другу; в – изображения приблизить друг к другу **Рис. 11**

Как было доказано на рис. 9, настройка осветителя очень важна, поэтому некоторые фирмы разрабатывают самонастраивающиеся узлы крепления ртутной лампы НВО 100 (рис. 12). Сенсорное устройство контролирует положение светящегося тела лампы относительно оптической оси осветителя. Оператор может определять осуществляемый контроль по трехкратному щелчку: Y-Z – движения коллектора. Подобный контроль позволяет исключить ошибки настройки.

Люминесцентный осветитель настраивается по принципу Келера и так же, как и в обычных осветителях отра-

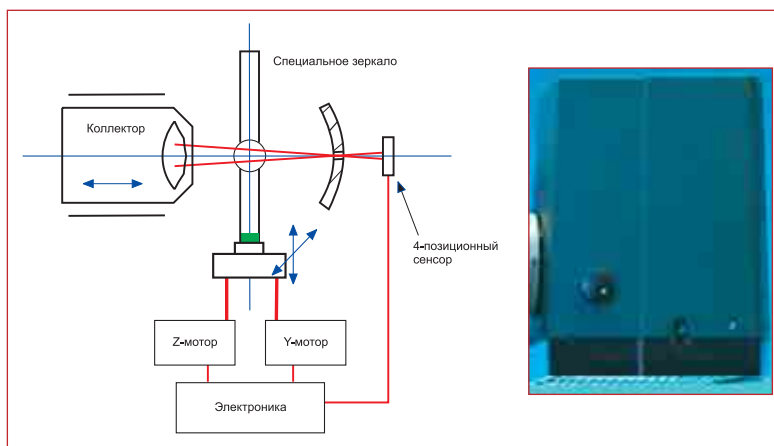


Схема работы и внешний вид самоцентрирующегося узла крепления ртутной лампы НВО 100 **Рис. 12**

женного и проходящего света, имеет апертурную и полевую диафрагмы. В отличие от осветителя проходящего света, где первой после источника света идет полевая диафрагма, а затем апертурная (в конденсоре), в осветителях отраженного света первой после источника света идет апертурная диафрагма, а затем – полевая.

Основные параметры, гарантирующие получение хороших результатов в люминесцентной микроскопии:

- **Высококачественные флуоресцентные светофильтры.** Важно сочетание возбуждающих и запирающих светофильтров, которые могут обеспечивать либо узкую полосу (длину волны) пропускания светящегося объекта (эти фильтры обеспечивают наблюдение только изумрудно-зеленого свечения в препарате – рис. 13, слева) или широкую полосу (эти фильтры обеспечивают наблюдение зеленого, красного и желтого свечения в препарате – рис. 13, справа).

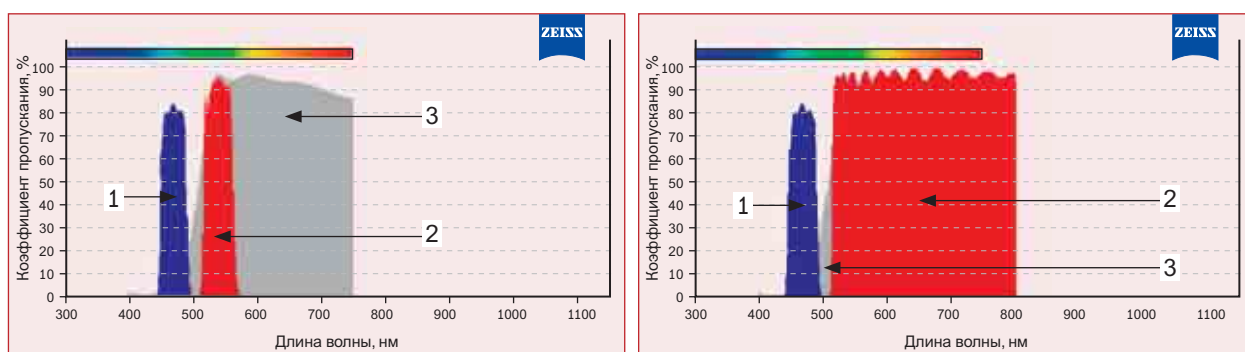


Рис. 13 Спектральные кривые пропускания люминесцентных светофильтров и полупрозрачного (дихроичного) зеркала: 1 (синяя) – спектральная кривая возбуждения (выделяется из ртутной лампы); 2 (красная) – спектральная кривая, пропускаемая запирающим светофильтром (то, что наблюдается в микроскопе); 3 (серая) – спектральная кривая, пропускаемая дихроичным зеркалом.
Слева – узкополосный (интерференционный) люминесцентный блок 10 (на темном фоне наблюдается яркое зеленое свечение: возбуждение 450–490 нм, эмиссия 515 нм, запирающий – 515–565 нм); справа – широкополосный люминесцентный блок 09 (на темном фоне наблюдаются зеленые и красные элементы: возбуждение 450–490 нм, эмиссия 515 нм, запирающий – 510 нм), блоки ф. Carl Zeiss

- **Высокая интенсивность возбуждения.** Источник света должен создавать высокую энергию возбуждения в очень узких диапазонах спектра. Характерным является диапазон от 10 до 50 нм, создаваемый линейчатыми излучателями. На практике это, как правило, ртутные лампы высокого давления.
- **Высокое светопропускание объективов.** Объективы микроскопа, в частности, для получения высококачественного изображения, зачастую состоят из большого количества отдельных линз. Несмотря на это, объективы для флуоресценции обладают высокими коэффициентами пропускания света даже в УФ-диапазоне.
- **Отсутствие собственной флуоресценции у оптических узлов микроскопа.** В этом случае, если линзы, светофильтры или иммерсионные жидкости, используемые в микроскопе, обладают собственной флуоресценцией, то возникающий при этом побочный свет «подмешивается» во флуоресцентное изображение. Это приводит к более светлому фону, снижающему контраст.
- **Высокая числовая апертура объектива.** Возбужденное в препарате флуоресцентное излучение распространяется по всем направлениям. Задачей объектива является «собрать» как можно больше такого излучения, однако при низкой числовой апертуре такой эффект незначителен. Гораздо эффективнее оказывается большой угол открытия (апертурный угол). При удвоенной апертуре объек-

тива удастся «захватить» почти в четыре раза больше флуоресцентного излучения. Посредством иммерсии, в частности, иммерсионного масла, можно дополнительно устранить световые потери, возникающие вследствие рефлексов на поверхностях. Изображение становится более контрастным.

Практические рекомендации по люминесцентной микроскопии:

- Рабочее помещение: при слабой люминесценции лучше всего работать в затемненном помещении. Во время работы не следует выходить в светлые помещения, смотреть на свет лампы или на светлые окна. Температура в помещении не должна быть выше 25 °С.
- Микроскоп с ртутной лампой должен быть установлен на столе и удален от стен на расстояние не менее 30–50 см, при этом над микроскопом могут находиться полки, но не ниже, чем на 1,0 м от микроскопа.
- Выцветание препаратов: если препарат не наблюдается и не фотографируется, то следует перекрыть свет возбуждения задвижкой со светофильтром в люминесцентном осветителе, чтобы предотвратить выцветание препарата.
- Иммерсионная жидкость, не обладающая люминесценцией: при использовании иммерсионных сред, обладающих собственной люминесценцией, фон становится светлее, что приводит к ухудшению контраста.
- Теплозащитный светофильтр: люминесцентные светофильтры чувствительны относительно исходящего от лампы теплового излучения. Поэтому ни в коем случае нельзя устранять встроенный тепловой светофильтр.
- Юстировка лампы: время от времени, но обязательно каждый раз после замены лампы, необходимо дополнительно юстировать лампу. В этих целях рекомендуется пользоваться инструкцией по обслуживанию и не забывать о мерах безопасности.

5 Техника микроскопического исследования препаратов

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

Образец организации рабочего места для микроскопического исследования препаратов люминесцентным методом представлен на рис. 14.

Для проведения микроскопического исследования при окраске флуорохромами необходимы:

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



Рис. 14 Рабочее место микроскописта

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

5.2. Порядок подготовки микроскопа и проведения микроскопического исследования препаратов

Порядок подготовки микроскопа к работе

Перед началом работы люминесцентный микроскоп должен быть в рабочем состоянии. Ремонт, профилактические осмотры и настройка микроскопа должны проводиться представителями сервисной технической службы не реже 1 раза в полгода. Несоблюдение правил настройки может привести к существенному снижению эффективности микроскопических исследований.

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

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

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

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

Перед началом исследования следует:

- Проверить наличие на столе для микроскопии необходимого для проведения микроскопического исследования оборудования и дополнительных материалов.
- Снять полиэтиленовый или пластиковый чехол, которым накрыт микроскоп.
- Осмотреть микроскоп и протереть сухой салфеткой части микроскопа: механические (предметный стол) и оптические (глазную линзу окуляров).
- Убедиться в целостности оптической системы осветителя и наличии необходимого комплекта светофильтров, соответствующих конструкции люминесцентного микроскопа и установленных в определенном ею порядке.
- Убедиться, что все диафрагмы люминесцентного осветителя (полевая и апертурная) открыты.
- Убедиться, что окулярные трубки бинокулярной насадки раздвинуты по индивидуальной глазной базе и что диоптрийная наводка на окулярной трубке или окуляре с маркировкой «foc» установлена в соответствии с индивидуальной настройкой для соответствующего глаза (чаще всего левого).

- С помощью специальной салфетки для линз или мягкой фланелевой ткани, *чуть* смоченной спиртоэфирной смесью, протереть первую линзу рабочих объективов микроскопа.
- Закрывать шторку, опустить защитный экран, включить блок поджига ртутной лампы в соответствии с инструкцией по эксплуатации, дать прогреться ртутной лампе 10–12 минут.
- Положить на предметный столик белый лист бумаги или белую окрашенную пластину, установить в ход лучей пустое гнездо (гнездо без объектива), открыть шторку и, глядя через защитный экран, убедиться, что светящееся тело ртутной лампы равномерно заполняет круг или яркий сдвоенный контур находится в его центре; закрыть шторку.
- Убедиться в том, что подготовленные для микроскопии окрашенные препараты достаточно хорошо высушены и расставлены в штативе в порядке регистрационных номеров, что они не имеют на обратной стороне следов краски.
- С помощью вращения винта грубой фокусировки (макровинта) опустить предметный столик, отдалив его от объектива.
- Поворотом револьверного устройства установить в ход лучей объектив с малым увеличением (8× или 10×).
- Поместить на столик предметное стекло, на котором расположен контрольный препарат таким образом, чтобы мазок находился прямо под объективом; при этом **обязательно убедиться, что мазок находится на верхней поверхности предметного стекла**, а не снизу.
- Закрепить препарат на столике с помощью клемм или откидной лапки препаратоводителя.
- С помощью рукояток перемещения препаратоводителя выбрать участок препарата для начала просмотра – для люминесцентного микроскопа это может быть край мазка или предметного стекла (при настройке в поле зрения должна быть видна пограничная зона).
- Медленно вращая винт грубой фокусировки (макровинт) и контролируя взглядом сбоку расстояние между предметным стеклом и нижним краем объектива, поднять предметный столик, оставляя между препаратом и объективом расстояние приблизительно 2–3 мм. **Не допускать соприкосновения предметного стекла с линзой объектива!**
- Открыть шторку осветителя.
- Глядя в окуляры, **медленно** вращать макровинт так, чтобы предметный столик начал опускаться от края объектива; вращать до тех пор, пока не появится изображение препарата (на черном или зеленоватом фоне контур края мазка или предметного стекла). Обычно для получения изображения достаточно несколько поворотов винта; расстояние до указанных объективов составляет, как правило, 4–5 мм.
- Глядя в окуляры, **медленно и в ту же сторону** вращать микровинт до тех пор, пока не появится изображение мазка. Небольшими поворотами микровинта получить резкое изображение мазка.
- Глядя правым глазом в правый окуляр, проверить резкость изображения мазка.
- Глядя левым глазом в левый окуляр, проверить резкость изображения мазка; если видно не резко, то с помощью диоптрийной наводки, расположенной на окулярной трубке или в окуляре с маркировкой «foc», получить резкое изображение для левого глаза.

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

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

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

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

Порядок проведения микроскопического исследования препаратов

Процесс микроскопического исследования препаратов на люминесцентном микроскопе представлен на рис. 15.

В препаратах, окрашенных флуорохромными красителями, интенсивность люминесценции окрашенного объекта сравнительно быстро снижается. Поэтому обычно *окрашенные флуорохромными красителями мазки не подлежат длительному хранению*



Микроскопическое исследование препаратов на люминесцентном микроскопе **Рис. 15**

на свету. По возможности микроскопическое исследование приготовленных препаратов рекомендуется проводить сразу же после окончания процедуры окрашивания люминесцентными красителями и высыхания мазков.

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

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

При окраске флуорохромными красителями контроль не выдержан в следующих случаях:

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

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

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

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

За счет использования меньших увеличений микроскопа при люминесцентной микроскопии размер поля зрения больше, чем при наблюдении в проходящем свете на обычном микроскопе, поэтому одинаковая площадь мазка на люминесцентном микроскопе будет просмотрена быстрее, чем на обычном. В связи с этим при исследовании мазка люминесцентным методом можно просматривать меньшее число полей зрения, чем при микроскопии в проходящем свете. Количество полей зрения, рекомендуемых для просмотра, зависит от используемого увеличения микроскопа.

Современные микроскопы комплектуются объективами с увеличением 20×, 40×, 63×, 100× и окулярами с увеличением 10× (линейные поля окуляров равны 18 и 20 мм), увеличение насадок составляет 1×. В таблице 2 представлены расчеты площадей и количества просматриваемых полей зрения препарата в зависимости от используемого в соответствии с современными стандартами увеличения микроскопа.

Помимо указанных в таблице 2 вариантов увеличений ранее в отечественной практике для люминесцентной микроскопии широко использовались также увеличения 250× и 450×. Однако следует отметить, что получить такие увеличения с помощью сочетания современных объективов, окуляров и насадок невозможно. Объективами

25×, 90× МИ, окулярами 5×, 7× (а также окулярами 10× с линейным полем 15 мм), насадками 1,5×, 1,1× комплектовалось устаревшее в настоящее время поколение микроскопов. Поскольку сейчас такие варианты оптики практически не производятся, увеличения 250× и 450× возможно реализовать лишь с помощью сочетаний устаревших объективов, окуляров и насадок.

Таблица 2

Площадь одного поля зрения, количество просматриваемых полей зрения и общая площадь просмотренного мазка в зависимости от увеличения микроскопа

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

Однако в некоторых лабораториях все еще используются старые модели микроскопов. В связи с этим, а также для наглядной демонстрации преимуществ современного поколения микроскопов в таблице 3 представлены расчеты для некоторых устаревших или трудно реализуемых сочетаний оптики.

В отечественной практике обычно используется следующая методика исследования препарата люминесцентным методом.

Для выдачи отрицательного результата исследования или выявления единичных КУМ, как правило, мазок просматривают от одного края до другого, выполняя при этом один или два параллельных прохода по препарату (в зависимости от размера мазка и используемого увеличения микроскопа).

Например, если мазок имеет стандартный размер 2×1 см, то при использовании увеличения 400× (объектив 40×, окуляр 10×/18, насадка 1×) рекомендуется выполнить, как минимум, один просмотр вдоль препарата (по длине мазка, которая равна 20 мм) либо 2 просмотра поперек препарата (по ширине мазка, которая равна 10 мм). Таким образом, общая длина просмотренного препарата должна составить примерно 20 мм, что включает в себя около 45 полей зрения (диаметр одного поля зрения – 0,45 мм). При этом будет просмотрена площадь препарата, равная 7,16 мм², что составляет 3,6% от общей площади мазка и вполне достаточно для выдачи отрицательного ответа.

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

Таблица 3

Площадь одного поля зрения, количество просматриваемых полей зрения и общая площадь просматриваемого мазка в зависимости от увеличения микроскопа

Общее увеличение	1000×		630×				450×		400×		250×			200×	
	100×	90×	60×	63×	90×	90×	90×	40×	40×	40×	25×	20×	20×	10×	20×
Увеличение объектива	10×	7×	10×	10×	7×	5×	90×	90×	40×	40×	25×	20×	20×	10×	20×
Увеличение окуляра	10×	7×	10×	10×	7×	5×	90×	90×	40×	40×	25×	20×	20×	10×	20×
Увеличение насадки	1×	1,5×	1×	1×	1,5×	1,5×	1×	1,125×	1×	1,125×	1×	1,125×	1,5×	1×	1×
Линейное поле окуляра, мм	15	18	15	20	18	23	23	18	15	15	18	20	18	8	15
Диаметр поля зрения на мазке, мм	0,15	0,13	0,25	0,30	0,25	0,17	0,26	0,40	0,38	0,60	0,72	0,80	0,80	0,53	0,75
Площадь одного поля зрения, мм ²	0,018	0,013	0,049	0,071	0,031	0,023	0,053	0,126	0,113	0,283	0,407	0,502	0,502	0,221	0,442
Количество полей зрения	300	300	150	100	240	300	140	60	65	25	20	15	15	30	20
Площадь мазка по кол-ву полей, мм ²	5,40	3,90	7,35	7,10	7,44	6,90	7,42	7,56	7,35	7,08	8,14	7,53	7,53	6,63	8,84

По окончании микроскопического исследования каждого препарата следует:

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

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

- с помощью специальной салфетки или фланелевой ткани протереть фронтальную линзу рабочих объективов микроскопа спиртоэфирной смесью или спиртом;
- опустить предметный столик микроскопа, отдалив его от объективов;
- выключить блок поджига ртутной лампы;
- через 10–15 минут (после того, как ртутная лампа остынет!) закрыть микроскоп полиэтиленовым или пластиковым пакетом;
- расставить все необходимое для микроскопии оборудование и дополнительные материалы в установленном порядке;
- снять и удалить одноразовые перчатки; вымыть руки с мылом;
- перенести результаты микроскопического исследования с листа в лабораторный регистрационный журнал и на бланки ответов, предварительно заполненные до начала микроскопии.

Вопросы

1. Какую особенность препаратов, окрашенных флуорохромными красителями, следует учитывать, проводя микроскопическое исследование?
2. Как подготовить люминесцентный микроскоп к работе? Какие существуют особенности режима работы люминесцентного микроскопа?
3. В каких случаях окрашенные флуорохромными красителями мазки не пригодны для исследования (не выдержан контроль)?
4. Опишите технику проведения микроскопического исследования.

5.3. Учет результатов микроскопического исследования при окраске препаратов флуорохромными красителями

Как уже указывалось ранее, препараты, окрашенные флуорохромными красителями, обычно просматривают под увеличением в пределах $200\times$ – $630\times$ (чаще всего используется увеличение $400\times$). Это значительно меньше, чем увеличение, используемое для просмотра препаратов, окрашенных карболовым фуксином ($1000\times$). В силу этого поле зрения, просматриваемое на люминесцентном микроскопе, имеет значительно большую площадь, чем поле зрения под объективом обычного микроскопа (табл. 2, 3).

Таким образом, при микроскопическом исследовании на люминесцентном микроскопе препарата, окрашенного флуорохромами, допускается просматривать меньшее количество полей зрения, чем при исследовании этого же препарата, окрашенного карболовым фуксином, на обычном микроскопе. В таблице 4 представлено рекомендуемое к просмотру число полей зрения для оценки мазка как отрицательного при использовании различных увеличений микроскопа.

Рекомендуемое число просматриваемых полей зрения для оценки мазка как отрицательного при различных увеличениях микроскопа

Кратность увеличения микроскопа	Количество рекомендуемых к просмотру полей зрения	Техника просмотра мазка
1000× <i>объектив 100× окуляр 10×/18 насадка 1×</i>	300 <i>площадь 300 полей зрения равна 7,5 мм²</i>	3 параллельных прохода вдоль мазка <i>длина мазка, равная 20 мм, включает в себя примерно 110 полей зрения</i>
630× <i>объектив 63× окуляр 10×/18 насадка 1×</i>	110–120 <i>площадь 110–120 полей зрения равна 7,3–7,9 мм²</i>	1,5–2 параллельных прохода вдоль мазка <i>длина мазка, равная 20 мм, включает в себя примерно 70 полей зрения</i>
450× <i>объектив 90× окуляр 5×/23 насадка 1×</i>	140–150 <i>площадь 140–150 полей зрения равна 7,4–8,0 мм²</i>	2 параллельных прохода вдоль мазка <i>длина мазка, равная 20 мм, включает в себя примерно 77 полей зрения</i>
450× <i>объектив 40× окуляр 10×/18 насадка 1,125×</i>	60 <i>площадь 60 полей зрения равна 7,6 мм²</i>	1,5 параллельных прохода вдоль мазка <i>длина мазка, равная 20 мм, включает в себя примерно 50 полей зрения</i>
400× <i>объектив 40× окуляр 10×/18 насадка 1×</i>	45–50 <i>площадь 45–50 полей зрения равна 7,2–8,0 мм²</i>	1 проход вдоль мазка <i>длина мазка, равная 20 мм, включает в себя примерно 45 полей зрения</i>
250× <i>объектив 25× окуляр 10×/18 насадка 1×</i>	20–25 <i>площадь 20–25 полей зрения равна 8,1–10,2 мм²</i>	1 проход вдоль мазка <i>длина мазка, равная 20 мм, включает в себя примерно 28 полей зрения</i>
200× <i>объектив 20× окуляр 10×/18 насадка 1×</i>	15–20 <i>площадь 15–20 полей зрения равна 9,5–12,7 мм²</i>	1 проход вдоль мазка <i>длина мазка, равная 20 мм, включает в себя примерно 22 поля зрения</i>

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

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

Учет результатов микроскопического исследования при окраске препаратов флуорохромными красителями и люминесцентной микроскопии проводится так же, как и при световой микроскопии (табл. 5).

Градации результатов микроскопического исследования люминесцентным методом

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

* Указать точное число КУМ.

** Соответствие градаций:

- точное число – единичные КУМ в препарате;
 1+ – единичные КУМ в полях зрения;
 2+ – умеренное количество КУМ;
 3+ – значительное количество КУМ.

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

- порядковый лабораторный номер;
- фамилия и инициалы больного;
- пол;
- возраст;
- адрес больного;
- районный регистрационный номер больного;
- название медицинского учреждения, направившего материал на исследование;
- номер истории болезни или карты больного;
- материал исследования;
- замечания по качеству материала;
- номер пробы материала (учет кратности обследования);
- цель проведения исследования (диагностика или мониторинг результатов химиотерапии, другое);
- результат микроскопического исследования.

Положительные результаты исследования рекомендуется вписывать в журнал **красными чернилами**. Затем на основании записей в лабораторном журнале необходимо подготовить индивидуальные ответы для каждого больного, используя специальные бланки ответов.

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

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

- оценка количества кислотоустойчивых микобактерий в препарате (табл. 5);
- дата исследования;
- фамилия сотрудника, проводившего анализ.

Результат следует отправлять в медицинское учреждение или врачу, запросившему исследование. **Никогда не ограничивайтесь выдачей результата пациенту!**

Вопросы

1. Сколько полей зрения рекомендуется просмотреть на люминесцентном микроскопе с использованием различных увеличений, прежде чем квалифицировать мазок как отрицательный?
2. Сколько полей зрения рекомендуется просмотреть на люминесцентном микроскопе при наличии значительного количества кислотоустойчивых микобактерий в мазке?

6 Хранение препаратов

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

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

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

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

Раздел по контролю качества микроскопических исследований для выявления кислотоустойчивых микобактерий изложен в базовом учебном пособии «Выявление туберкулеза методом микроскопии».

