



РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
 Міністэрства аховы здароўя
 ГАЛОЎНЫ ДЗЯРЖАЎНЫ
 САЇТАРНЫ ЁРАЧ
 РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

220048, г. Мінск, вул. Мяснікова, 39
 факс 222-64-59 E-mail: obabuk@health. med. by.

Телефон 222-69-97

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
 Министерство здравоохранения
 ГЛАВНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
 САНИТАРНЫЙ ВРАЧ
 РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

220048, г. Минск, ул. Мясникова, 39
 факс 222-64-59 E-mail: obabuk@health. med. by.

«03» _____ 2004 г. № _____

На № _____

ПОСТАНОВЛЕНИЕ № 49

Об утверждении Инструкции 4.2.11-19-9-2004
 «Паразитологические методы лабораторной
 диагностики гельминтозов и протозоозов»

Во исполнение Закона Республики Беларусь «О санитарно-эпидемическом благополучии населения» в редакции от 23 мая 2000 года (Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь, 2000 г., № 52, 2/172) постановляю:

1. Утвердить прилагаемую Инструкцию 4.2.11-19-9-2004 «Паразитологические методы лабораторной диагностики гельминтозов и протозоозов» и ввести ее в действие на территории Республики Беларусь с 01 сентября 2004 г.

2. Главным государственным санитарным врачам административных территорий данное постановление довести до сведения всех заинтересованных.

3. Контроль за исполнением постановления возлагаю на заместителя Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь Филонова В.П.

Первый заместитель Главного государственного
 санитарного врача Республики Беларусь

 М.М.Мазик

УТВЕРЖДЕНО
Постановление
Первого заместителя
Главного государственного
санитарного врача
Республики Беларусь
03 мая 2004г. № 49

Инструкция 4.2.11-19-9-2004
«Паразитологические методы лабораторной
диагностики гельминтозов и протозоозов»

ГЛАВА 1
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Лабораторные исследования на гельминтозы и протозоозы проводятся аккредитованными для этих целей клинико-диагностическими и бактериологическими (паразитологическими) лабораториями организаций здравоохранения Республики Беларусь, независимо от ведомственной принадлежности и формы собственности.

2. Настоящая инструкция является обязательной при выполнении лабораторных исследований биологического материала от людей с целью обнаружения паразитирующих в организме гельминтов и простейших.

ГЛАВА 2
ВВЕДЕНИЕ

3. Насчитывается свыше 250 видов паразитирующих у человека гельминтов, вызывающих заболевания – гельминтозы, и 50 видов одноклеточных простейших, вызывающих заболевания – протозоозы.

4. Качество лабораторной диагностики и уровень выявляемости возбудителей паразитарных заболеваний зависят:

от тщательности выполнения методик исследования;

правильности отбора и своевременности доставки материала в диагностические лаборатории;

знания циклов развития гельминтов, простейших, а также путей выделения из организма человека, морфологического строения яиц гельминтов и различных форм простейших.

5. Методы лабораторной диагностики паразитарных заболеваний применяются:

с диагностической целью;

для контроля эффективности лечения паразитарных заболеваний;

для оценки качества проведения комплекса противопаразитарных мероприятий;

с целью выявления источников заражения;

для установления уровня пораженности населения.

6. Настоящая инструкция включает паразитологические методы лабораторной диагностики наиболее распространенных паразитарных заболеваний.

ГЛАВА 3

ОТБОР ПРОБ И УСЛОВИЯ ДОСТАВКИ МАТЕРИАЛА
В ЛАБОРАТОРИЮ ДЛЯ ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

7. Материалом для лабораторных паразитологических исследований на гельминтозы и протозоозы служит различный биологический материал от человека: дуоденальное содержимое, кал, ректальная слизь, моча, отделяемое бронхов, кровь, биопсийные ткани и другие.

8. Требования по отбору и доставке в лабораторию проб фекалий (кала, копроматериала).

8.1. Проба в количестве не менее 50 г (объем примерно от чайной до столовой ложки) отбирается сразу после дефекации из разных участков каловой массы и помещается в чистую (прокипяченную), сухую, стеклянную или пластмассовую посуду с крышкой.

8.2. При заборе фекалий для исследования на амебиаз стеклянная (пластиковая) посуда должна быть стерильной.

8.3. Копроматериал доставляется в лабораторию и исследуется в день его отбора.

8.4. Для обнаружения яиц стронгилоида кал должен быть исследован не позднее 1 часа после дефекации; для обнаружения личинок стронгилоида, яиц анкилостомид и трихостронгилид - не позднее 4 часов после дефекации.

8.5. Для обнаружения вегетативных (подвижных) форм дизентерийной амебы кал необходимо исследовать не позднее 20 минут после дефекации (при температуре хранения 4⁰С - не позднее 40 минут).

8.6. Для обнаружения вегетативных форм кишечных простейших (лямблий, диэнтамеб и других) время до проведения лабораторных исследований не должно превышать 1,5 часов.

9. Отбор проб фекалий в консерванты (при невозможности исследования копроматериала согласно п. 8).

9.1. Осуществляется: низкотемпературным (от 0 до +4⁰С) способом – на срок до одних суток или при помощи химических консервантов (на более длительные сроки).

9.2. В качестве химических консервантов применяются:

жидкость Барбагалло, состоящая из раствора формалина с физиологическим раствором (3 мл формалина 40% + 97 мл физраствора или 30 мл формалина 40% + 1 л дистиллированной воды + 8,5 г хлорида натрия);

раствор формалина 4%;

смесь раствора формалина 4% с равным количеством глицерина;

раствор уксусной кислоты от 3 до 10%;

раствор детергентов 1-1,5% из моющих (стиральных) средств типа «Лотос», «Экстра» (кроме биоактивных); перед приготовлением раствора из стирального порошка удаляют влагу путем выдерживания в сушильном шкафу при 100⁰С в течение 2 часов.

9.3. Для консервации копроматериала с помощью химических средств кал заливается одним из приготовленных консервантов в объеме 1:1 или 1 часть фекалий и 2 части раствора консерванта при тщательном перемешивании индивидуальной палочкой.

9.4. Фекалии в растворах консервантов сохраняются от нескольких месяцев до

года; при более длительном хранении возможно разрушение яиц гельминтов.

9.5. Для консервации простейших кишечника используется консервант Турдыева, состоящий из 80,0 мл раствора азотистокислого натрия 0,2% (0,16 г NaNO_2 + 80,0 мл воды дистиллированной), 2,0 мл глицерина, 10 мл концентрированного формалина (аптечного) и 8,0 мл концентрированного раствора Люголя; смешивается в соотношении: 1 часть кала и 3 части консерванта.

9.6. Для хранения отдельных особей гельминтов или их фрагментов используются химические консерванты:

- раствор формалина 10%;
- спирт этиловый 70%;
- жидкость Барбагалло;
- глицерин.

9.7. Для консервации мышц с личинками трихинелл используется концентрированный раствор хлористого натрия (на 100 мл воды 40-50 г NaCl).

10. Отбор соскобов с перианальных складок.

10.1. Осуществляется при помощи:

- шпателей с ватными тампонами смоченными в глицерине;
- глазных палочек, покрытых специальным клеевым слоем;
- прозрачной полиэтиленовой липкой ленты.

10.2. Оптимальные сроки отбора проб: утром (до подмывания) или, при обследовании детей, посещающих детские дошкольные учреждения - после дневного сна.

10.3. После забора соскоба шпатели вкладываются обратно в пробирку, липкая лента наклеивается на предметное стекло, а глазные палочки вкладываются в соответствующий флакон или специальный контейнер со штативами.

10.4. Пробирки, флаконы, предметные стекла предварительно маркируются (при массовых обследованиях маркируются цифрами согласно списку обследуемых).

11. Отбор дуоденального содержимого (желчи).

11.1. Осуществляется в 3 пробирки (порции «А», «В», «С») путем зондирования пациента натошак.

11.2. Порцию «А» доставляют для исследования на патогенные простейшие двенадцатиперстной кишки (лямблии), личинки стронгилоида, трихостронгилид, анкилостомид.

11.3. Порции «В» и «С» доставляют для исследования на яйца гельминтов, паразитирующих в протоках печени и поджелудочной железы.

11.4. Все 3 пробы исследуются сразу после поступления в лабораторию.

12. Отбор проб мокроты.

12.1. Осуществляется при откашливании (не слюна и не слизь с носоглотки) в стерильную посуду с крышкой (можно в чашку Петри) и исследуется сразу после поступления в лабораторию.

13. Отбор проб мочи.

13.1. Утренний сбор осуществляется в чистую стеклянную посуду с крышкой и исследуется сразу после поступления в лабораторию.

13.2. Для исследования на шистосомоз моча собирается в интервале от 10 до 14 часов или все порции суточной мочи; сбор желательно осуществлять после физической нагрузки (например, 20-30 приседаний).

14. Отбор проб эпидермиса кожи.

14.1. Производится с измененных или зудящих участков кожи несколькими срезами.

14.2. Поверхностные срезы кожи диаметром 2-3 мм делают бескровно, с соблюдением асептики, стерильным лезвием бритвы или глазным скальпелем, предварительно приподняв кожу кончиком стерильной иглы.

14.3. Кусочки кожи помещают в стерильную стеклянную посуду (можно чашки Петри) с физраствором и исследуют сразу после забора материала.

15. Биопсия мышечной ткани (поперечно-полосатой мускулатуры).

15.1. Биоптаты мышечной ткани получают хирургическим путем из двуглавой или икроножной мышц (ближе к сухожилию) и исследуют сразу после биопсии.

15.2. Если лабораторное исследование откладывается на какой-то срок, пробы мышц помещают в консервант или замораживают; консервантом может служить раствор хлорида натрия 30-50%.

16. Отбор проб для контроля эффективности лечения кишечных, печеночных гельминтозов и протозоозов.

16.1. После лечения геогельминтозов кишечника кал отбирается через месяц после проведенного лечения, а после лечения протозоозов кишечника кал отбирается в зависимости от выявленного заболевания: при амебиазе, балантидиазе – сразу после лечения, при лямблиозе – через неделю.

16.2. После лечения контактных гельминтозов: при гименолепидозе кал отбирается через 1 и 6 месяцев после лечения; при энтеробиозе перианальный соскоб отбирается через 4-6 дней после лечения.

16.3. После лечения биогельминтозов кал отбирается через 3-4 месяца после проведенного курса лечения.

16.4. При первом отрицательном результате (исследования фекалий), отбор проб проводится еще двукратно с интервалом 2-4 дня, после чего ставится окончательный результат лабораторного анализа.

16.5. После лечения инвазий желчевыводящих путей контроль эффективности можно проводить как при исследовании кала, так и желчи, применяя соответствующие методы лабораторного исследования.

16.6. При стронгилоидозе контроль эффективности проводится только путем исследования желчи (даже, если паразит был обнаружен копроскопическими методами) через месяц после лечения.

ГЛАВА 4

ВЫБОР МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАРАЗИТАРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

17. Макро– и микроскопические паразитологические методы лабораторной диагностики являются прямыми методами обнаружения гельминтов, их фрагментов, яиц и личинок гельминтов; вегетативных и цистных форм патогенных простейших, при обнаружении и идентификации которых не требуются косвенные методы исследования.

18. При обследовании больного в направлении для лаборатории необходимо указать предварительный диагноз, что позволит лаборанту выбрать соответствующую методику для выявления или исключения данного вида возбудителя.

19. При отсутствии в направлениях врачей четкого диагноза и затруднении в

выборе эффективного метода лабораторного исследования на кишечные простейшие и гельминты больного лучше обследовать с применением «комплексного» метода исследования фекалий из консерванта или универсального метода формалин-эфирного (уксусно-эфирного) осаждения.

20. При применении большинства паразитологических методов лабораторной диагностики учитывается эпидемиологический анамнез пребывания обследуемого на эндемичной по тем или иным паразитарным заболеваниям территории; контакт с домашними животными; геофагия или употребление в пищу продуктов питания, которые могут явиться источником заражения, и т.д.; а также результаты косвенных и клинических методов обследования больного (серологические исследования, результаты рентгеноскопии, УЗИ, результаты общего анализа крови и т.д.).

ГЛАВА 5

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕКАЛИЙ МАКРОСКОПИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

21. Макроскопические методы служат для обнаружения в кале целых половозрелых гельминтов или их фрагментов невооруженным глазом или с помощью ручной лупы.

22. Метод визуального осмотра фекалий (после дефекации) с последующим последовательным промыванием копроматериала.

22.1. Позволяет выявить:

активно ползающих остриц, реже – аскарид и власоглавок;

фрагменты стробила дифиллоботриид;

проглотида (в виде «лапши») свиного цепня, реже (ввиду способности к активному выползанию из анального отверстия) – бычьего цепня.

22.2. Эффективен для дифференциальной диагностики:

половозрелых гельминтов кишечника от непереваренных частиц и других включений кала и идентификации найденных паразитов;

члеников бычьего и свиного цепня (учитывая, что обнаруживаемые при микроскопическом исследовании онкосферы этих тениид совершенно идентичны).

22.3. Применяется:

перед микроскопическими методами исследования фекалий;

при контроле эффективности лечения после применения лекарственных препаратов, не вызывающих деструкцию паразита (глистогонных средств);

при идентификации зрелых паразитов или их фрагментов, например: для дифференциальной диагностики члеников цестод (бычьего и свиного цепней, широкого и чаечного лентецов).

22.4. Фекалии сначала осматривают целиком, затем разводят дистиллированной водой до жидкой консистенции и небольшими порциями исследуют при хорошем освещении.

23. Для лучшего просмотра фекалий применяют способ отстаивания.

23.1. Необходимые реактивы и оборудование:

глицерин;

физиологический раствор;

дистиллированная вода;

химические стаканы;

чашки Петри;

черная бумага;

пинцеты;
 препаровальные иглы;
 предметные стекла большие (6x10; 8x12 см);
 лотки эмалированные;
 лупа, микроскоп и стереоскопический микроскоп типа МБС.

23.2. Ход исследования:

фекалии размешивают в большом количестве воды, в высоких стеклянных стаканах (банках) после чего отстаивают;

надосадочную жидкость сливают, а осадок вновь смешивают с водой и сливают до тех пор, пока надосадочный слой не станет прозрачным;

небольшие порции осадка переносят в чашки Петри и тщательно просматривают под лупой, а лучше под стереоскопическим микроскопом МБС;

все подозрительные частицы и крупные образования пинцетом или препаровальной иглой переносят на отдельное предметное стекло или чашку Петри и рассматривают под лупой между двумя предметными стеклами или под микроскопом МБС;

мелких гельминтов или сколексы цестод рассматривают в капле глицерина или физраствора под микроскопом при увеличении: окуляр x7 или x10, объектив x8 или x10;

микроскопия всех визуально обнаруженных в кале паразитов или фрагментов обязательна для уточнения морфологических особенностей и идентификации паразита.

ГЛАВА 6

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕКАЛИЙ

24. Метод толстого мазка под целлофаном по Като и Миура.

24.1. Применяется:

при массовых обследованиях населения на кишечные гельминтозы, например: при обследовании декретированных контингентов взрослого населения и детей организованных коллективов;

в случаях, когда в направлениях в клиничко-диагностические лаборатории отсутствуют конкретные диагнозы или указания, на какие инвазии необходимо обследовать больного;

при необходимости сохранения препаратов в качестве музейных (при комнатной температуре яйца большинства кишечных гельминтов, за исключением анкилостомид и карликового цепня, сохраняются в течение длительного времени).

24.2. Необходимые реактивы (их назначение), оборудование:

глицерин (просветляет мазок);

раствор фенола 6%: 100мл дистиллированной воды + 6 г фенола (дезинфицирует препарат);

раствор малахитового зеленого 3 %: 2,5г малахитовой зелени + 75 мл дистиллированной воды (снимает напряжение глаз микроскописта);

целлофан (гигроскопический);

предметные стекла;

палочки стеклянные или деревянные;

валик или резиновая пробка;

микроскоп.

24.3. Приготовление рабочего раствора Като: 100 мл раствора фенола 6 % + 100 мл глицерина + 1,2 мл раствора малахитового зеленого 3% (раствор можно хранить длительное время в склянке из темного стекла с притертой крышкой); при отсутствии фенола и малахитовой зелени можно использовать раствор глицерина (50 мл глицерина + 50 мл дистиллированной воды).

24.4. Подготовка целлофановых полосок:

полоски из гидрофильного целлофана (гидрофильный целлофан горит, в отличие от полиэтиленовой пленки, которая плавится и непригодна для исследования) нарезать по размеру предметного стекла;

поместить в рабочий раствор Като не менее чем на 24 часа до проведения анализа (в 200 мл рабочего раствора Като можно обрабатывать до 5 тысяч целлофановых полосок).

24.5. Ход исследования:

на предметное стекло нанести 30-50 мг фекалий (размером с горошину) и растереть индивидуальной палочкой (стеклянной, деревянной);

фекалии накрыть целлофановой полоской, обработанной в растворе Като и сверху притереть резиновой пробкой или специальным валиком (ширина валика должна соответствовать или быть немного больше ширины предметного стекла) до получения тонкого, равномерного, прозрачного слоя;

препарат выдержать при комнатной температуре в течение 1 часа или в термостате при 40°C в течение 20-30 минут;

24.6. Микроскопировать при увеличении: объектив x8 или x10, окуляр x7 или x10 (для уточнения морфологического строения яиц гельминтов объектив x40).

24.7. Сравнительная эффективность метода:

позволяет просмотреть в 20-30 раз больше фекалий, чем в нативном мазке;

выявляет яйца кишечных и печеночных гельминтов при высокой и средней интенсивности инвазии;

менее эффективен для выявления инвазий низкой интенсивности.

25. Формалин-эфирный метод.

25.1. Относится к методам седиментации (осаждение и концентрация яиц гельминтов в осадке за счет использования химреактивов с более низким удельным весом).

25.2. Применяется:

как универсальный метод диагностики кишечных и печеночных гельминтозов и протозоозов,

как специальный метод для диагностики трематодозов, включая описторхоз,

как количественный метод определения интенсивности инвазии.

25.2. Необходимые реактивы и оборудование:

раствор формалина 10% (10 мл формалина аптечного + 90 мл дистиллированной воды);

этиловый эфир медицинский;

раствор Люголя 1%;

центрифужные градуированные пробирки;

воронки стеклянные;

металлическое ситечко чайное или бинт (марля);

предметные и покровные стекла;

деревянные и стеклянные палочки;

пипетки;
 резиновые пробки;
 микроскоп;
 центрифуга на 3000 оборотов в минуту (об/мин).

25.4. Ход исследования:

в центрифужную градуированную пробирку налить 7 мл раствора формалина 10%, добавить 1 г фекалий (такое количество фекалий, чтобы раствор в пробирке поднялся до 8 мл) и тщательно перемешать стеклянной или деревянной палочкой (индивидуальной для каждого обследуемого) до образования однородной смеси;

полученную смесь процедить через воронку с металлическим ситечком или двухслойным бинтом в другую центрифужную пробирку, заполнив ее процеженным раствором до отметки 8 мл (если объем меньше, то дополнить раствором формалина 10%, ополоснув им предварительно воронку с бинтом, через который процеживали раствор фекалий);

добавить 2 мл эфира, доведя объем жидкости в пробирке до 10 мл, закрыть пробкой и энергично встряхивать в течение 30 секунд (встряхивать желательно в вытяжном шкафу, в горизонтальном положении, придерживая при этом пробку);

смесь центрифугировать в течение 1 минуты при 3000 об/мин или в течение 2 минут при 1500 об/мин;

после центрифугирования в пробирке образуется 4 слоя: эфир, «каловая пробка», раствор формалина и на дне осадок, в котором будут содержаться яйца гельминтов и цисты простейших;

«каловую пробку» палочкой отделить от стенок пробирки и вместе с надосадочной жидкостью вылить, перевернув пробирку вверх дном, с краев пробирки убрать ватным тампоном лишнюю влагу, чтобы она не стекала на дно пробирки, перевернуть пробирку опять дном вниз;

весь осадок, оставшийся на дне пробирки, нанести на предметное стекло пипеткой или непосредственно из пробирки; капли должны быть небольшими, по 2 на одном предметном стекле;

в одну из капель осадка внести каплю раствора Люголя 1%, после чего обе капли накрыть покровным стеклом (жидкость не должна выступать за края стекла или затекать на покровное стекло);

каплю с раствором Люголя исследуют на цисты и ооцисты простейших, а каплю без Люголя исследуют на яйца и личинки гельминтов.

25.5. Микроскопировать: на яйца и личинки гельминтов при увеличении – объектив х8 или х10, окуляр х7 или х10, для уточнения морфологического строения яиц гельминтов – объектив х40; на цисты простейших – объектив х40.

25.6. Сравнительная эффективность метода:

выявляет инвазии с высокой, средней и низкой интенсивностью;

применяется для выявления яиц, личинок гельминтов кишечника и печени, цист и ооцист простейших кишечника, но практически не выявляет стадии трофозоитов;

не снижает эффективности при исследовании фекалий из консервантов.

26. Уксусно-эфирный метод (седиментация):

26.1. Применяется:

как универсальный метод диагностики кишечных и печеночных гельминтозов и протозоозов;

как специальный метод для диагностики трематодозов, включая описторхоз;
как количественный метод определения интенсивности инвазии.

26.2. Необходимые реактивы и оборудование:

водный раствор уксусной кислоты 5% (5мл ледяной уксусной кислоты + 95мл дистиллированной воды);
раствор Люголя 1%;
этиловый эфир медицинский;
центрифужные градуированные пробирки;
воронки стеклянные;
металлическое ситечко чайное или двухслойный бинт;
предметные и покровные стекла;
палочки деревянные и стеклянные;
пипетки;
бинт (марля);
резиновые пробки;
микроскоп;
центрифуга на 3000 об/мин.

26.3. Ход исследования:

в центрифужные градуированные пробирки налить 5 мл раствора уксусной кислоты 5%, добавить 1г фекалий (чтобы раствор в пробирке поднялся до отметки 6мл), тщательно перемешать деревянной или стеклянной палочкой (индивидуальной для каждого обследуемого), закрыть пробирку резиновой пробкой и интенсивно встряхнуть до образования однородной смеси;

дать отстояться в течение 1 минуты, после чего процедить через воронку с металлическим ситечком или двухслойным бинтом в другую центрифужную пробирку, заполнив до объема 6 мл (если меньше – долить раствором уксусной кислоты 5% после ополаскивания воронки с бинтом, через который процеживали суспензию фекалий);

добавить в пробирку 4 мл эфира (до метки 10 мл), закрыть пробкой и энергично встряхивать в горизонтальном положении, придерживая пробку (желательно в вытяжном шкафу), в течение 30 секунд до получения эмульгированной смеси;

смесь центрифугируют в течение 1 минуты при 3000 об/мин или в течение 2 мин при 1500 об/мин;

после центрифугирования в пробирке различают 4 слоя: в верхней части пробирки эфирный экстракт, «каловая пробка», раствор уксусной кислоты и на дне небольшой осадок (уксусная кислота эмульгирует фекалии, проникает в неперева-ренные частицы, состоящие преимущественно из клетчатки; удельный вес смеси эфира с уксусной кислотой меньше удельного веса воды, поэтому фекалии вместе с неперева-ренными крупными частицами клетчатки поднимаются в виде пробки в верхнюю часть пробирки, а яйца гельминтов и цисты простейших, обладающие большим удельным весом, выпадают в осадок);

«каловую пробку» круговым движением палочки отделить от стенок пробирки и вместе с надосадочной жидкостью вылить, при этом излишки влаги удалить ватным тампоном с края пробирки, оставив на дне осадок;

осадок (как правило, небольшой, бесцветный) нанести на предметные стекла пипеткой или непосредственно из пробирки, капли должны быть небольшими, по 2 на одном предметном стекле;

в одну из капель осадка внести каплю раствора Люголя 1%, после чего обе капли накрыть покровным стеклом (жидкость не должна выступать за края стекла или затекать на покровное стекло);

каплю с раствором Люголя исследуют на цисты и ооцисты простейших, а каплю без Люголя исследуют на яйца и личинки гельминтов;

26.4. Микроскопировать: на яйца и личинки гельминтов при увеличении – объектив x8 или x10, окуляр x7 или x10, для уточнения морфологического строения яиц гельминтов – объектив x40; на цисты простейших – объектив x40.

26.5. Сравнительная эффективность метода:

эффективно выявляет инвазии с высокой, средней и низкой интенсивностью;

применяется для выявления яиц, личинок гельминтов кишечника и печени, цист и ооцист простейших кишечника;

раствор уксусной кислоты 5% не оказывает деформирующего воздействия на цисты и ооцисты простейших (при исследовании оформленных и неоформленных фекалий), но не сохраняет стадии трофозоитов);

не снижает эффективности при использовании фекалий из консервантов.

27. Химико-седиментационный метод.

27.1. Применяется для выявления яиц гельминтов кишечника и печени.

27.2. Необходимые реактивы и оборудование:

азотнокислый натрий;

раствор уксусной кислоты 1%;

раствор уксусной кислоты 10%;

эфир этиловый медицинский;

ареометр;

воронки стеклянные;

марля (бинт);

центрифужные пробирки;

предметные и покровные стекла;

пипетки стеклянные;

стеклянные или деревянные палочки;

центрифуга;

микроскоп.

27.3. Подготовка рабочего раствора азотно-кислого натрия с удельным весом 1,15:

800-900 г вещества (необходимо подобрать количество индивидуально, т.к. химическое вещество из разных расфасовок может дать разный удельный вес) растворяют порциями в 1 л горячей воды в эмалированной посуде при постоянном перемешивании до полного растворения;

после остывания приготовленного раствора до комнатной температуры проводят измерение удельного веса ареометром;

если раствор готовится заранее, то необходимо его готовить с более высоким удельным весом, т.к. через 24 часа плотность раствора начинает падать.

27.4. Ход исследования:

в градуированную центрифужную пробирку налить 6 мл рабочего раствора азотнокислого натрия;

в другую пробирку налить 7 мл раствора уксусной кислоты 1%;

в пробирку с уксусной кислотой внести пробу фекалий 0,5-1 г (до отметки 7,5-

8 мл) и тщательно перемешать стеклянной палочкой;

смесь процедить через воронку с одним слоем марли (бинта) в пробирку с азотно-кислым натрием и центрифугировать при 1500-2000 об/мин в течение 5 минут;

надосадочную жидкость из пробирки слить, а к оставшемуся осадку добавить 3-4 мл раствора уксусной кислоты 10 % и 0,5 мл эфира;

пробирку закрыть резиновой пробкой и, придерживая ее, энергично встряхнуть (делается в вытяжном шкафу), после чего провести повторное центрифугирование в течение 1 минуты;

надосадочную жидкость слить, а осадок перенести на предметное стекло пипеткой;

каплю (или несколько капель) осадка накрыть предметным стеклом.

27.5. Микроскопировать при увеличении: объектив x8 или x10, окуляр x7 или x10; для уточнения морфологического строения яиц гельминтов – объектив x40.

27.6. Сравнительная эффективность метода:

после дополнительной обработки осадка химреактивами в нем остаются только яйца гельминтов, что облегчает их выявление;

по эффективности примерно одинаков с уксусно-эфирным осаждением, но более трудоемок.

28. Методы флотации (всплытия).

28.1. В основе лежит использование химреактивов с более низким удельным весом за счет чего происходит всплытие и концентрация яиц гельминтов в поверхностной пленке растворов.

28.2. Применяются для обнаружения яиц гельминтов кишечника.

28.3. Необходимые реактивы и оборудование:

один из флотационных растворов;

ареометр;

проволочная петля (из нескольких круглых петель диаметром от 0,5 до 1 см);

предметные стекла (обезжиренные);

пипетки стеклянные;

химические стаканчики емкостью 30-50 мл;

кюветы эмалированные;

чашки Петри;

стеклянные или деревянные палочки;

спиртовка.

28.4. Приготовление флотационного раствора по одной из нижеописанных прописей:

раствор (№ 1) нитрата аммония NH_4NO_3 (гранулированной или обычной селитры) плотностью 1,3 готовят из расчета 1500 г вещества на 1 л горячей воды;

раствор (№ 2) нитрата натрия NaNO_3 или азотнокислого натрия (предложенный автором Калантарян) с плотностью 1,38-1,4 готовят из расчета 1000 г вещества на 1 л горячей воды;

раствор (№ 3) тиосульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (гипосульфита натрия) с плотностью 1,4 готовят из расчета 1750 г вещества на 1 л горячей воды;

раствор (№ 4) сульфата натрия Na_2SO_4 или английской соли с плотностью 1,26-1,28 готовят из расчета 920 г вещества на 1 л горячей воды;

насыщенный раствор (№ 5) хлорида натрия NaCl (поваренной соли) с плотно-

стью 1,18-1,2 (предложенный автором Фюллеборном) готовят из расчета 400-420 г соли на 1 л кипящей воды;

любую из выше предложенных солей растворяют порциями в горячей воде в эмалированной посуде при постоянном перемешивании до полного растворения;

фильтровать приготовленные растворы не обязательно;

удельный вес флотационных растворов измеряется ареометром только после остывания раствора при комнатной температуре;

если раствор приготовлен в большом количестве, то в последующие дни перед исследованием его подогревают с размешиванием осадка и после остывания раствора снова измеряют удельный вес ареометром;

28.5. Подготовка предметных стекол: предметные стекла обязательно обезжирить, например, в смеси Никифорова (равные части этилового спирта и эфира).

28.6. Ход исследования:

в химический стаканчик объемом 30-50 мл налить немного одного из выше описанных флотационных растворов (стаканчик лучше предварительно поставить в чашку Петри), поместить в него 2,5 г фекалий (объем с большой «боб») и тщательно размешать палочкой (индивидуальной для каждого обследуемого);

удалить сразу же после размешивания всплывшие крупные частицы палочкой (или ложечкой с дырочками) и, постепенно, добавлять солевой раствор до 50 мл;

накрыть химический стаканчик предметным стеклом и добавлять флотационную жидкость (пипеткой) до полного их соприкосновения;

оставить взвесь приготовленную с растворами №№ 1 и 5 на 30-60 минут, с растворами №№ 2,3 и 4 – на 30 минут;

после вышеуказанной экспозиции снять предметное стекло с химического стаканчика, перевернуть и положить сухой поверхностью на стекло большего размера.

28.7. Микроскопировать без покровного стекла при увеличении: объектива х8, х10, окуляр х7, х10; уточнение морфологического строения – окуляр х40.

28.8. При снятии поверхностной пленки проволоочной петлей (лучше использовать петли с несколькими ячейками) исследовать целесообразно не менее 8 капель; микроскопировать под покровным стеклом (можно и без покровного стекла, предварительно на предметное стекло нанести каплю глицерина, в которой размазывают каплю с петли).

28.9. Петли перед и после исследования обжигают на пламени спиртовой горелки.

28.10. Сравнительная эффективность метода:

наиболее эффективен для обнаружения яиц нематод и цестод; при использовании флотационного раствора с удельным весом 1,38-1,40 удается выявить (всплывают) также и неоплодотворенные яйца аскарид;

неэффективен для выявления яиц трематод.

29. Копроларвоскопический метод Бермана.

29.1. Основан на положительном термо- и гидротаксисе личинок.

29.2. Применяется как специальный метод для диагностики стронгилоидоза.

29.3. Необходимое оборудование:

штатив;

стеклянная воронка (диаметром 10см);

металлическое сито или сетка «мельничный газ»;

резиновая трубка с зажимом;

предметные стекла;
 стеклянные или деревянные палочки;
 чашки Петри;
 центрифуга;
 микроскоп.

29.4. Собирается аппарат Бермана: в штативе закрепляется стеклянная воронка с металлическим ситом, на нижний конец которой надевается резиновая трубка с зажимом.

29.5. Ход исследования:

пробу фекалий 20-50 г поместить на металлическое сито или мелкоячеистую металлическую сетку, или сетку «мельничный газ»;

сетку с пробой фекалий приподнять и в воронку налить нагретую до 40-50⁰С воду таким образом, чтобы нижняя часть сетки с калом была погружена в воду;

через 2-4 часа зажим на резиновой трубке быстро открыть и жидкость спустить в центрифужную пробирку;

полученную жидкость центрифугировать 1-2 мин, после чего надосадочную жидкость быстро слить.

29.6. Осадок перенести на предметное стекло или в чашку Петри и микроскопировать при увеличении: объектив х8 или х10, окуляр х7 или х10; можно использовать микроскоп бинокулярный стереоскопический (далее – МБС); уточнение морфологического строения при увеличении: объектив х40, окуляр х10.

29.7. Сравнительная эффективность метода:

эффективен при выявлении рабдитовидных личинок стронгилоида;

эффективность методики возрастает при увеличении экспозиции фекалий в воде.

30. Метод Бермана в модификации Супряги.

30.1. Применяется:

для диагностики стронгилоидоза при массовых обследованиях;

для диагностики простейших – балантидий, при экспозиции фекалий в воде до 1,5-2 часов.

30.2. Необходимые реактивы и оборудование:

дистиллированная вода;

химические стаканчики;

стеклянные палочки;

чашки Петри;

пробирки центрифужные;

стереоскопический микроскоп МБС.

30.3. Ход исследования:

в химический стаканчик положить порцию фекалий 10–15 г (величиной с орех) и залить теплой (40⁰С) дистиллированной водой, чтобы фекалии были полностью покрыты;

через 20–30 минут слить жидкость в центрифужные пробирки и дать отстояться 10-15 минут или центрифугировать 1 минуту при 1500 об/мин;

осторожно слить надосадочную жидкость, а осадок поместить в чашку Петри и исследовать под бинокулярным стереоскопическим микроскопом с нижней подсветкой (объектив х2, окуляр х12, х14), обращая внимание на подвижных, слабоподвижных и неподвижных личинок.

30.4. Неподвижные личинки микрокопировать с увеличением: объектив х8, х10 и х40; окуляр х10.

30.5. Сравнительная эффективность метода:

эффективен при высокой и средней интенсивности инвазии и менее эффективен при низкой;

рекомендуется сочетать с исследованием дуоденального содержимого.

31. Метод культивирования личинок на фильтровальной бумаге (метод Харада-Мори в модификации Маруашвили).

31.1. Применяется при диагностике анкилостомидозов.

31.2. Необходимое оборудование:

фильтровальная бумага (размером 16х 3,5 см);

стеклянная банка (0,7-0,8 л);

полиэтиленовая пленка;

термостат;

центрифуга;

водяная баня.

31.3. Ход исследования:

на фильтровальную бумагу, оставляя края свободными, нанести свежевыделенные фекалии в виде мазка;

смочить стенки банки водой и опустить в нее фильтровальную бумагу так, чтобы края (без фекалий) зафиксировались на влажных ее стенках;

в банку налить воды, чтобы в нее погрузился нижний конец бумаги (без фекалий) и закрыть полиэтиленовой пленкой или чашкой Петри;

банку поставить в термостат при температуре 28⁰С на 5-6 дней или, в теплое время года, оставить при комнатной температуре на 8-10 дней.

31.4. Работа должна проводиться с соблюдением техники безопасности, так как часть личинок может подняться вверх по фильтровальной бумаге – для этого целесообразно перед просмотром лабораторного материала личинки предварительно убить, поместив банку в водяную баню при температуре 50⁰С на 15 минут.

31.5. Микрокопировать при увеличении: объектив х8 или х10, окуляр х7 или х10 (можно использовать микроскоп МБС); уточнение морфологического строения при увеличении: объектив х40, окуляр х10.

ГЛАВА 7

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРИАНАЛЬНЫХ СОСКОБОВ

32. Исследования перианальных соскобов (эффективны для выявления яиц гельминтов, находящихся на перианальных складках: яйца остриц и онкосферы тениид).

33. Оборудование и реактивы зависят от способа получения соскоба и, помимо обязательного микроскопа, могут включать: деревянные шпатели, шпатели с ватным тампоном, предметные и покровные стекла, полоски прозрачной липкой ленты, глазные палочки со специальным клеевым слоем, а также пробирки, флаконы, штативы и кассеты для их переноски.

34. При массовых обследованиях населения (в основном детского) следует заранее подготовить шпатели с тампонами и пробирки, или предметные стекла с липкой лентой, флаконы, или специальные штативы с глазными палочками, покрытыми клеевым слоем. Промаркировать предметные стекла, пробирки или флаконы,

либо маркировать во время забора материала у обследуемых, согласно номеру по списку. Методы отбора соскобов с перианальных складок приведены в п.10.

35. Метод перианального соскоба липкой лентой по Грэхэм.

35.1. Применяется как для индивидуального, так и для массового обследования населения.

35.2. Используется полиэтиленовая прозрачная пленка с липким слоем для детского технического творчества или операционная пленка, предварительно наклеенная на предметные стекла отрезками по 8-10 см длиной.

35.3. Перед взятием соскоба отклеить полоску липкой ленты от предметного стекла и, держа ее за концы, плотно прижать всей липкой поверхностью к анусу и перианальным складкам, стараясь пальцами рук не касаться перианальной области.

35.4. После нескольких прижатий к коже перианальной области полоску липкой стороной наклеивают обратно на предметное стекло, избегая образования воздушных пузырей, мешающих микроскопии; концы ленты, выходящие за края стекла, отрезаются.

35.6. Микроскопировать при увеличении: объектив x8 или x10, окуляр x7 или x10.

36. Метод перианального соскоба с применением стеклянных глазных палочек с клеевым слоем по Рабиновичу.

36.1. Используются стеклянные глазные палочки с клеевым слоем следующей прописи: клеол – 10 мл, касторовое масло – 2,5 мл, этиловый эфир – 5мл, этиловый спирт 96,5% – 2,5 мл (хранится во флаконе по 20,0 мл с плотно притертой пробкой).

36.2. Стеклянные глазные палочки (лучше с широкими лопаточками) предварительно промываются, обезжириваются, стерилизуются кипячением или автоклавированием и высушиваются.

36.3. Лопаточку глазной палочки обмакнуть в клей и просушить не менее 2-4 часов в вертикальном положении (лопаточкой вверх) для образования равномерной пленки и стекания избытка клея (клеякая пленка сохраняет свои свойства не менее недели).

36.4. Глазные палочки установить в специальный штатив, где каждая ячейка имеет свой номер, или использовать пронумерованные пенициллиновые флаконы, предварительно закрепив ручку глазной палочки в резиновой пробке от этого пузырька.

36.5. Взять соскоб путем соприкосновения или «отпечатка» плоской частью лопаточки обеих сторон с кожей перианальных складок.

36.6. Снова укрепить палочку в штативе или пенициллиновых пузырьках (промаркированных соответственно номеру, присвоенному обследуемому по списку, или регистрационному номеру в журнале) для доставки в лабораторию.

36.7. Укрепить глазную палочку в специальном держателе для просмотра под микроскопом.

36.8. Микроскопировать непосредственно плоскую поверхность лопаточки поочередно с обеих сторон при увеличении: окуляр x7 или x10, объектив x8 или x10.

36.9. Использованные палочки дезинфицировать кипячением в мыльном растворе, тщательно промыть, прополоскать, обезжирить в смеси Никифорова, просушить в сухожаровом шкафу; штатив и кассеты обработать 70%-ным спиртом и промыть мыльно-содовым раствором; пенициллиновые пузырьки и резиновые

пробки дезинфицировать кипячением или автоклавированием.

37. Метод перианального соскоба по Торгушину.

37.1. Используется ватный тампон, накрученный на деревянном или стеклянном шпателе, смоченный в растворе глицерина.

37.2. Приготовленным тампоном обтереть перианальные складки вокруг ануса.

37.3. На предметное стекло поместить каплю глицерина и, слегка ударяя по предметному стеклу, обмыть в этой капле использованный тампон.

37.4. Полученный препарат микроскопировать без покровного стекла при увеличении: объектив х8 или х10, окуляр х7 или х10.

37.5 Недостаток метода в том, что часть яиц остается на ватном тампоне; неудобен при массовых обследованиях.

38. Метод перианального соскоба по Кеворковой.

38.1. В центрифужную пробирку налить около 5 мл кипяченой или дистиллированной воды и поместить в него шпатель (палочку) с ватным тампоном.

38.2. Перед забором соскоба тампон слегка отжать о внутреннюю стенку пробирки, после чего обтереть им перианальные складки обследуемого.

38.3. Шпатель с тампоном вложить в пробирку с водой и тщательно прополоскать.

38.4. Шпатель с тампоном из пробирки удалить, а полученный смыв центрифугировать в течение 3 минут при 1500 об/мин.

38.5. Надосадочную жидкость слить, а осадок перенести на предметное стекло, покрыть покровным стеклом и микроскопировать при увеличении: объектив х8 или х10, окуляр х7 или х10.

38.6. Недостаток метода: неудобен при массовых обследованиях.

ГЛАВА 8

КОПРОПРОТОЗООСКОПИЯ

(ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕКАЛИЙ НА КИШЕЧНЫЕ ПРОСТЕЙШИЕ)

39. Метод нативного мазка с физраствором и раствором Люголя.

39.1. Применяется для диагностики кишечных протозоозов: лямблиоза, балантидиаза, амебиаза, кокцидиоза (изоспороза); при интенсивной инвазии можно также обнаружить яйца гельминтов и личинки стронгилоида.

39.2. Необходимые реактивы и оборудование:

физиологический раствор;

раствор Люголя 1%;

буферный раствор метиленового синего;

уксусно-кислый спиртовой раствор йода;

предметные и покровные стекла;

деревянные палочки;

стеклянные пипетки;

стерильная стеклянная или пластиковая посуда (для забора фекалий);

микроскоп.

39.3. Фекалии исследуют не позднее 15-20 мин после дефекации (при условии хранения в холодильнике при температуре 4-5⁰С – не позднее 1 часа), что дает возможность обнаружить подвижные вегетативные формы (трофозоиты) простейших; в пробу отбираются неоформленные фекалии, участки слизи или прожилки в кале.

39.4. Подготовка реактивов к работе:

подогреть до 36-37⁰С физиологический раствор;

приготовить маточный 5% раствор Люголя (10 г йодида калия растворить в 30 мл дистиллированной воды + 5 г кристаллического йода, размешать до полного растворения и долить до 100 мл дистиллированной водой; после приготовления хранить в емкости из темного стекла);

приготовить рабочий 1% раствор Люголя (5 мл маточного 5%-ного раствора Люголя соединить с 20 мл физиологического раствора, хорошо перемешать; хранить в емкости из темного стекла не более 14 дней);

приготовить буферный раствор метиленового синего: 50 мл дистиллированной воды + 46,3 мл раствора уксусной кислоты (1,2 мл ледяной уксусной кислоты + 98,8 мл дистиллированной воды) + 3,7 мл раствора уксуснокислого натрия (1,6 г уксуснокислого натрия + 100 мл дистиллированной воды) + 0,5 г метиленового синего; приготовленный раствор хорошо перемешивается, настаивается 15 мин и фильтруется;

приготовить уксусно-кислый спиртовой раствор йода: 10 мл спиртового раствора Люголя (40 мл 70%-ного этилового спирта + несколько кристаллов йода, хорошо перемешать, раствор должен иметь цвет «крепкого чая») + 10 мл 25%-ного раствора уксусной кислоты.

39.5. Ход исследования:

нанести на предметное стекло 1 каплю изотонического теплого (36-37⁰С) раствора в левой половине и 1 каплю 1%-ного раствора Люголя в правой половине предметного стекла;

выбрать из пробы фекалий деревянной палочкой патологические примеси или немного фекалий (с булавочную головку) и перенести в каплю физраствора; растереть до получения равномерной негустой эмульсии, а затем поместить в каплю с Люголем и также растереть;

накрыть капли покровным стеклом (через правильно приготовленный мазок можно видеть газетный шрифт).

39.6. Микроскопировать при увеличении: объектив х8 или х10, окуляр х10, затем, для дифференциальной диагностики амёб и жгутиковых, включая лямблии и дизентамебу, переключить на объектив х40.

39.7. Для дифференциальной диагностики трофозоитов дизентерийной амёбы с непатогенными амёбами необходимо:

нанести на предметное стекло большую каплю буферного раствора метиленового синего, внести в нее деревянной палочкой небольшое количество слизи, фекалий с прожилками крови, накрыть покровным стеклом, дать постоять 5-10 мин, чтобы краска проникла в трофозоиты, и сразу микроскопировать для исключения перекрашивания трофозоитов;

в результате окрашивания: трофозоиты амёб окрашиваются в разные оттенки синего (ядро синее, цитоплазма голубая, эритроциты синие); цисты амёб, трофозоиты и цисты жгутиковых и ооцисты кокцидий не окрашиваются;

39.8. Для выявления ооцист кокцидий по вышеописанной методике (нативного мазка с физраствором и раствором Люголя):

вместо капли 1%-ного раствора Люголя на правую половину предметного стекла наносится капля уксусно-кислого спиртового раствора йода;

палочкой вносится небольшое количество фекалий, растирается, накрывается

покровным стеклом и микроскопируется при тех же увеличениях;

ооцисты изоспоры выявляются, благодаря хорошей окраске ядер.

39.9. Сравнительная эффективность метода:

позволяет выявлять вегетативные формы патогенных простейших и комменсалов, анализировать тип их движения (что имеет важное значение при видовой идентификации простейших, особенно жгутиковых), определять видовые признаки цист амёб и жгутиковых, ооцист кокцидий (благодаря эффективной окраске йодом ядер, жгутикового аппарата, гликогена);

при диагностике амебиаза эффективна только при строгом соблюдении стерильного забора фекалий и исследовании не позднее 15-20 мин после дефекации.

40. Комплексный метод исследования фекалий на кишечные простейшие и гельминты из консерванта.

40.1. В основе лежит «диагностическая система» КТ-ФЭО-МЦН: консервант Турдыева, формалин-эфирное обогащение, модифицированный метод окраски Циля-Нильсена.

40.2. Метод универсален для диагностики кишечных паразитозов, вызываемых простейшими (амёбы, жгутиковые, включая диентамебу, изоспоры, балантидии и кокцидии) и гельминтами (нематоды, трематоды и цестоды); наиболее эффективен при сочетанных инвазиях.

40.3. Условия отбора материала для исследования:

фекалии (оформленные – с лесной орех, жидкие – с чайную или столовую ложку) максимально быстро после дефекации с помощью деревянной палочки переносятся в стерильный флакон с консервантом Турдыева в соотношении 3 части консерванта и 1 часть фекалий;

флакон закрывают крышкой, предварительно тщательно размешав фекалии деревянной палочкой до гомогенной суспензии.

40.4. В консерванте Турдыева паразиты фиксируются, сохраняя длительное время свои морфологические признаки, что в дальнейшем обеспечивает возможность исследования материала из единой пробы:

методом влажного мазка из консерванта согласно п.41.;

методом мазка из осадка после эфир-формалинового обогащения консервированного материала согласно п.42.;

модифицированным методом окрашивания по Цилю-Нильсену мазка из осадка после обогащения материала из консерванта согласно п.43.

41. Метод влажного мазка из консерванта.

41.1. Необходимое оборудование и реактивы:

консервант Турдыева;

раствор Люголя 1%-ный;

предметные и покровные стекла;

деревянные палочки;

микроскоп.

41.2. Ход исследования:

на правую и левую часть предметного стекла пипеткой из консерванта с фекалиями, очень осторожно, не взбалтывая содержимое флакона, наносятся по одной капле придонного осадка и растираются деревянной палочкой;

в одну из капель добавляется аналогичное количество раствора Люголя 1%-ного, после чего обе капли накрываются покровным стеклом (покровные стекла

можно окантовать вазелином для предотвращения высыхания и смещения покровного стекла) и микроскопируются при увеличении: объектив х8 или х10, окуляр х7 или х10; затем объектив переводится на х40, а в отдельных случаях (например, для криптоспоридий) на х90 или х100 и исследуются с масляной иммерсией.

41.3. Метод эффективен для выявления цист и трофозоитов простейших, включая редко выявляемую диентамебу, а также яиц и личинок гельминтов. Ооцисты при достаточном количестве обнаруживаются в верхнем слое мазка непосредственно под покровным стеклом по эффекту негативного окрашивания раствором Люголя.

42. Метод исследования материала из консерванта формалин–эфирным обогащением.

42.1. Применяется для диагностики цист кишечных простейших и яиц гельминтов.

42.2. Необходимое оборудование и реактивы:

физиологический раствор;

раствор Люголя 1%;

этиловый эфир;

раствор формалина 10% нейтральный (для нейтрализации – во флакон темного стекла с раствором формалина на дно слоем в 1-2 см насыпать порошкообразный углекислый кальций);

палочки деревянные;

центрифужные градиурованные пробирки;

воронки стеклянные;

бинт (марля);

стекла предметные и покровные;

пипетки стеклянные;

пробирки резиновые;

центрифуга;

микроскоп.

42.3. Ход исследования:

перенести пипеткой в центрифужную пробирку осадок фекалий со дна флакона с консервантом в объеме 1,5-2 мл;

добавить 6-7 мл 10% нейтрального формалина;

закрывать пробирку резиновой пробкой и тщательно перемешать, энергично встряхивая пробирку в течение 5 секунд;

полученную взвесь перелить в другую центрифужную пробирку через стеклянную воронку с двухслойным бинтом (марлей);

добавить 2-3 мл этилового эфира;

закрывать пробирку пробкой и энергично встряхнуть в течение 30 секунд;

убрать пробку и дать постоять пробирке в течение 2 мин в вытяжном шкафу;

центрифугировать 2 мин при 1500 об/мин или 1-1,5 мин при 3000 об/мин;

отделить палочкой образовавшуюся «каловую пробку» от стенок пробирки;

перевернуть пробирку дном вверх и вылить содержимое (можно ватным тампоном обтереть стенки пробирки, чтобы жидкость не стекала на дно и не увеличивала объем осадка), пробирку поставить в штатив;

на предметное стекло по обе стороны от центра нанести по капле физиологического раствора и раствора Люголя;

перенести каждую каплю осадок из центрифужной пробирки, размешать деревянной палочкой и накрыть каждую каплю покровным стеклом.

42.4. Микроскопировать при увеличении: объектив x8 или x10, окуляр x7 или x10, затем с объективом x40 (при необходимости использовать окуляр x90 или x100 с масляной иммерсией).

43. Модифицированный метод окрашивания по Цилю–Нильсену мазков из осадка после обогащения консервированного материала.

43.1. Применяется для выявления ооцист кокцидий, включая криптоспоридии и изоспоры.

43.2. Необходимые реактивы и оборудование:

смесь Никифорова;

серная кислота 10%;

фуксин основной;

фенол;

палочки деревянные;

предметные стекла;

химические стаканчики или «мостики» для окрашивания мазков;

стеклянные пипетки;

кюветы эмалированные;

микроскоп.

43.3. Ход исследования:

на предметное стекло нанести пипеткой каплю осадка из центрифужной пробирки после обогащения согласно п.42. и круговым движением палочки приготовить мазок (можно добавить каплю физиологического раствора, чтобы мазок не был густым);

тщательно высушить на воздухе;

фиксировать мазок в смеси Никифорова в течение 20-30 мин;

после фиксации мазок высушить на воздухе;

окрашивать мазок в растворе карболового фуксина, поместив мазок в химический стаканчик с этой краской на 45 мин;

промыть мазок проточной водой;

обесцветить мазок в 10% растворе серной кислоты до прекращения отхождения розовых «облачков» красителя;

промыть тщательно проточной водой;

подкрасить мазок 5% раствором малахитового зеленого, приготовленного на 10% этиловом спирте в течение 2-5 мин;

промыть мазок в воде;

высушить мазок на воздухе;

микроскопировать при увеличении: окуляр x10, объектив x90 или x100 с масляной иммерсией.

43.4. Метод более эффективен по сравнению со стандартной методикой диагностики ооцист кокцидий (криптоспоридий и изоспор) за счет предварительной фиксации в консерванте и обогащения осаждением.

44. Метод Бермана в модификации для исследования на балантидиаз.

44.1. Применяется для диагностики балантидиаза; позволяет выявлять трофозоиты паразита при низкой интенсивности инвазии.

44.2. Необходимые реактивы и оборудование:

дистиллированная вода;
химические стаканчики;
палочки деревянные;
чашки Петри;
пробирки центрифужные;
центрифуга;
микроскоп.

44.3. Ход исследования:

в химический стаканчик или в чашку Петри положить порцию фекалий (предварительно перемешав) 10-15 г (величиной с орех);

залить теплой (45⁰С) дистиллированной водой, чтобы фекалии были полностью покрыты;

через 1,5–2 ч слить жидкость в центрифужные пробирки;

центрифугировать 2 мин при 1500 об/мин;

надосадочную жидкость слить, осадок с помощью стеклянной пипетки перенести на предметное стекло (по 2 капли на каждое стекло), накрыть покровными стеклами.

44.4. Микроскопировать при увеличении: объектив х10, окуляр х10; для уточнения морфологических особенностей: объектив х40; окуляр х10.

45. Методы окрашенных мазков на криптоспориоз (по Цилю–Нильсену; Романовскому–Гимзе).

45.1. Применяются для диагностики криптоспориоза; метод окраски фиксированных мазков по Цилю–Нильсену считается одним из наиболее надежных для выявления ооцист криптоспоридий.

45.2. Необходимые реактивы и оборудование:

фуксин основной, этиловый спирт, фенол, раствор серной кислоты 7% (5–10%), раствор малахитовой зелени 5%-ный в 10%-ном этиловом спирте, водный раствор метиленового синего 0,2%-ный, раствор малахитового зеленого 5%-ный, азур-эозин по Романовскому–Гимзе 10%-ный, флотационные растворы;

предметные стекла;

стеклянные или деревянные палочки;

горелка (спиртовка);

кюветы эмалированные;

мостики стеклянные или «контейнеры» для окраски мазков;

пипетки, стеклянные капилляры;

груши резиновые;

химические стаканчики;

центрифужные пробирки объемом 15 мл;

металлические петли;

центрифуга;

микроскоп.

45.3. Приготовление рабочего раствора краски по Цилю–Нильсену:

фуксина основного 2 г растворить в 12 мл спирта 96 %;

фенола 5 г растворить в 50 мл дистиллированной воды;

слить вместе растворы фуксина и фенола, долить дистиллированной воды до 100 мл и перемешать.

45.4. Приготовление из фекалий материала для исследования методом натив-

ного мазка:

нанести на предметное стекло небольшое количество фекалий;

растереть фекалии тонким слоем (при необходимости к комочку фекалий добавляют 1-2 капли физиологического раствора или воды);

тщательно высушить мазок на воздухе (не менее 30 мин).

45.5. Обогащение пробы для исследования флотационным методом:

приготовить флотационный раствор (в качестве флотационного раствора использовать насыщенный раствор хлористого натрия или насыщенный раствор сульфата цинка – 331 г сульфата цинка на 1 л водопроводной воды);

разбавить фекалии водой и размешать;

процедить разбавленные фекалии через двухслойный бинт в центрифужную пробирку;

центрифугировать при 1500 об/мин в течение 3–4 минут;

удалить супернатант (объем оставшегося осадка не должен превышать 1мл);

добавить флотационную жидкость до половины объема пробирки;

размешать содержимое пробирки стеклянной палочкой;

центрифугировать при 1500 об/мин в течение 3–4 минут;

собрать поверхностную пленку металлической петлей или стеклянным капилляром и поместить на предметное стекло.

45.6. Обогащение пробы для исследования методом седиментации:

поместить в пробирку 0,5–1 г фекалий;

залить 10–12 мл изотонического раствора хлорида натрия;

перемешать содержимое пробирки до образования однородной суспензии;

процедить суспензию через двойной слой марли в другую пробирку и центрифугировать;

слить надосадочную жидкость;

повторно залить осадок изотоническим раствором хлорида натрия и центрифугировать;

слить надосадочную жидкость;

перенести осадок пипеткой на предметное стекло;

приготовить из осадка мазок.

45.7. Ход исследования:

высушить мазки на воздухе (мазки готовить одним из способов согласно пп. 45.4.-45.6);

фиксировать мазки в смеси Никифорова в течение 10–15 минут;

высушить на воздухе;

фиксированные и высушенные мазки быстро провести 3–5 раз над пламенем горелки;

поместить мазок в рабочий раствор карбол-фуксина на 5–10 минут;

промыть мазок водопроводной водой, после чего обесцветить 7%-ным раствором серной кислоты в течение 20–60 секунд;

промыть в воде;

подкрасить в течение 5 минут 5%-ным раствором малахитовой зелени;

промыть в воде;

высушить на воздухе.

45.8. Микроскопировать при увеличении: окуляр x10, объектив x90 или x100 с масляной иммерсией.

45.9. Результат:

ооцисты криптоспоридий окрашиваются в разные оттенки ярко-красного цвета и имеют вид округлых образований диаметром около 5 мкм;
 оболочка ооцист окрашивается фуксином неравномерно;
 сопутствующая микрофлора окрашивается в зеленые цвета.

45.10. Для окрашивания фиксированных мазков можно так же применять азур-эозин по Романовскому–Гимза с экспозицией от 10 до 30–45 мин в 10%-ном растворе красителя; при этом ооцисты не окрашиваются или окрашиваются слабо и имеют вид округлых образований; внутри ооцист или по периферии могут быть видны спорозоиты в виде бледно-голубых удлинённых и слегка изогнутых телец с красноватыми гранулами внутри.

ГЛАВА 9

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ КОПРООВОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

46. Количественными методами определяют число яиц гельминтов в 1 г или 1 мл фекалий. Данные методы дают ориентировочные представления об интенсивности инвазии, позволяют судить об эффективности лечения гельминтозов при частичном паразитологическом излечении.

47. Метод толстого мазка под целлофаном по Като–Кац (количественная модификация метода Като и Миура).

47.1. Применяется для определения интенсивности инвазии при клинико-диагностических обследованиях и при массовых обследованиях для определения напряженности очага инвазии.

47.2. Необходимые реактивы и оборудование:

раствор Като (согласно п.24);

целлофан гидрофильный;

предметные стекла;

валик или резиновая пробка;

микроскоп;

пластинка размером 40x30 мм (из пластмассы или металла) с отверстием в центре диаметром 6 мм.

47.3. Ход исследования:

на предметное стекло поместить пластинку с отверстием;

произвольную навеску фекалий поместить на отверстие пластинки;

прокатать резиновой пробкой или пластмассовой разовой палочкой материал так, чтоб через отверстие в пластинке на стекло выдавилась стандартная навеска;

пластинку убрать;

препарат обработать по стандартной методике Като согласно п.26.;

при микроскопии просматривается весь мазок и ведется подсчет обнаруженных яиц гельминтов;

чтобы определить количество яиц в 1 г фекалий: число яиц, обнаруженных в данном препарате, следует умножить на коэффициент, равный 24.

48. Методы формалин – эфирного и уксусно-эфирного осаждения.

48.1. Основаны на исследовании 1 г фекалий (количество фекалий, внесенное в пробирку и вызвавшее подъем жидкости на 1 мл, равно 1 г). При просмотре всего осадка полностью методы дают возможность провести количественный учет обнаруженных яиц, т.к. количество яиц в осадке соответствует нахождению их в 1 г фе-

калий.

48.2. Данные методы описаны в пунктах 25 и 26.

ГЛАВА 10

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДУОДЕНАЛЬНОГО СОДЕРЖИМОГО

49. Исследования дуоденального содержимого.

49.1. Применяется для выявления яиц трематод (описторхиса, клонорха, фасциол, дикроцелий), вегетативных и цистных форм простейших – лямблий, личинок стронгилоида, трихостронгилид и анкилостомид.

49.2. Необходимые реактивы и оборудование:

этиловый эфир;

центрифуга;

центрифужные пробирки;

предметные стекла;

пипетки;

чашки Петри;

палочки стеклянные или деревянные;

микроскоп.

49.3. Подготовка к работе:

желчь в лабораторию должна быть доставлена сразу после зондирования;

при подозрении на лямблиоз, стронгилоидоз, анкилостомоз, трихостронгилез тщательно исследуют порцию «А», исследование порций «В» и «С» более информативно при печеночных трематодозах;

в желчи, исследуемой сразу после зондирования, обычно обнаруживаются вегетативные подвижные формы лямблий и подвижные личинки стронгилоида; при исследовании желчи через несколько часов после зондирования (но в день забора материала) подвижность личинок стронгилоида и вегетативных форм лямблий обычно не наблюдается.

49.4. Наиболее эффективно сочетание исследования желчи нативно и с центрифугированием; исследование желчи на яйца трематод эффективно только при центрифугировании.

50. Исследования нативного мазка желчи.

50.1. Ход исследования:

выбрать сгустки слизи, волокон, патологические примеси;

стеклянной или деревянной палочкой (можно пипеткой) нанести тонким слоем желчь на предметное стекло, так чтобы мазок не стекал с предметного стекла;

при исследовании в чашке Петри налить желчь тонким слоем на дно чашки.

50.2. Микроскопировать без покровного стекла при увеличении: объектив x8 или x10, окуляр x10; для уточнения морфологии яиц гельминтов и для исследования на простейших – объектив x40; для обнаружения подвижных личинок стронгилоида можно микроскопировать в чашках Петри под стереомикроскопом МБС (окуляр x2; объектив x12,5–14).

51. Исследования желчи с центрифугированием.

51.1. Ход исследования:

при наличии в желчи большого количества слизи или гноя взболтать все порции с равным количеством эфира;

центрифугировать в центрифужных пробирках все порции дуоденального со-

держимого не менее 20 минут при 1500–2000 об/мин;

надосадочную часть желчи слить в отдельную емкость;

осадок перенести пипеткой или прямо из пробирки на предметное стекло.

51.2. Микроскопировать без покровного стекла при увеличении: объектив x8 или x10, окуляр x10; и для уточнения морфологии яиц гельминтов и для исследования на простейших – объектив x40; для обнаружения подвижных личинок стронгилоидеса можно микроскопировать в чашках Петри под стереомикроскопом МБС (окуляр x2; объектив x12,5–14).

ГЛАВА 11

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОКРОТЫ, ПРОМЫВНЫХ ВОД БРОНХОВ, ЛАВАЖНОЙ ЖИДКОСТИ

52. Микроскопическое исследование мокроты.

52.1. Применяется для диагностики легочных гельминтозов.

52.2. Эффективно для выявления яиц парагонимуса, томинкса, иногда шистосом; менее эффективно при диагностике личиночных стадий кишечных нематод в период миграции через легкие (личинки аскарид, анкилостомид, стронгилоидеса); можно обнаружить личиночные стадии эхинококков (сколексы эхинококка, альвеококка) при поражении легких и прорыве пузырей в бронх.

52.3. Необходимые реактивы и оборудование:

0,5% раствор NaOH или KOH;

центрифужные пробирки;

предметные стекла, большие предметные стекла;

центрифуга;

микроскоп.

52.4. Подготовка к работе:

мокроту, представляющую собой патологический секрет дыхательных путей, вместе с отделяемым носоглотки и полости рта, собрать в стерильную (можно прокипяченную) стеклянную емкость с крышкой и исследовать сразу после доставки в лабораторию; исследуется мокрота, выделенная при откашливании (не слюна и не слизь с носоглотки);

при слизисто-гнойной мокроте для лучшего растворения слизи, гноя: мокроту в пробирке смешивают с равным объемом 0,5%-ного раствора едкой щелочи; пробирку слегка подогревают на водяной бане и энергично встряхивают в течение 5 минут.

53. Исследование нативного мазка мокроты.

53.1. Подготовка к работе осуществляется согласно п.52.4.

53.2. Ход исследования:

мокроту из стеклянной емкости пипеткой перенести на предметное стекло (лучше большее);

приготовить мазок путем равномерного растирания между двумя предметными стеклами или нанесения и равномерного растирания палочкой на большом предметном стекле.

53.3. Микроскопировать при увеличении: объектив x8 или x10, окуляр x10, для уточнения морфологических особенностей окуляр x40.

54. Исследование мокроты с центрифугированием.

54.1. Подготовка к работе осуществляется согласно п.52.4.

54.2. Ход исследования:

перелить мокроту в центрифужные пробирки;
 центрифугировать в течение 3 – 5 мин при 1500 об/мин.;
 слить надосадочную жидкость;
 перенести осадок пипеткой или сразу из пробирки на предметное стекло.

54.2. Микроскопировать при увеличении: объектив х8 или х10, окуляр х10, для уточнения морфологических особенностей окуляр х40.

55. Исследование окрашенных мазков на пневмоцистоз (аналогичным методом на пневмоцистоз может исследоваться: слизь из горла и гортани, аспираты из бронхов, биоптаты и мазки-отпечатки легочной ткани).

55.1. Эффективно при условии немедленного исследования материала и использования двух вариантов окрашивания параллельно.

55.2. Необходимые реактивы:

для приготовления мазков – муколитики (0,3%-ный дитиотреитол в 0,02 М ЭДТА, рН=7,0) или ацетилцистеин, или 4%-ный раствор NaOH; формалин, спирт;

для окраски мазков по Романовскому–Гимза – смесь Никифорова; сульфатно-уксусный реагент (45 мл ледяной уксусной кислоты и 15 мл концентрированной серной кислоты) – 10%-ная краска Романовского–Гимзы в фосфатном буфере рН = 7,2;

для окраски мазков толуидиновым синим – толуидиновый синий 0,15%-ный (75 мг толуидинового синего + 15 мл дистиллированной воды + 0,5 мл концентрированной соляной кислоты + 35 мл абсолютного спирта); водный метиловый желтый 0,25%-ный;

для окраски по Гомори–Грохотту – формалин 10%-ный; дистиллированная вода; раствор хромовой кислоты (5 г хромово-кислотного оксида + 95 мл дистиллированной воды), 1%-ный раствор метабисульфита калия (или натрия); рабочий раствор серебра (100 мл водного 3%-ного раствора метенамина или уротропина + 5 мл водного 5%-ного нитрата серебра) – готовится непосредственно перед употреблением; 5%-ный водный тетраборат натрия (бура); диметилсульфоксид; раствор хлорного золота 0,2%-ный; водный раствор тиосульфата соды 2%-ный; лихтгрюн (0,02 г лихтгрюна + 100 мл дистиллированной воды + 5 капель ледяной уксусной кислоты);

для окраски акридиновым оранжевым – маточный раствор: 100 мл акридина оранжевого растворяют в 100 мл дистиллированной воды, рабочий раствор готовится при разведении маточного раствора в 10–100 раз физиологическим раствором, абсолютный метанол (получают обезвоживанием с помощью окиси кальция с последующей дистилляцией).

55.3. Необходимое оборудование:

центрифужные пробирки;
 стеклянные палочки;
 предметные стекла (желательно использовать альбуминизированные стекла);
 термостат;
 центрифуга;
 микроскоп.

55.4. Подготовка к работе:

мокроту или другой материал рекомендуется исследовать немедленно; в исключительных случаях возможно временное сохранение лаважной жидкости с по-

мощью консервации (заморозка до -4°C или заливка в стоящей во льду посуде 50 мл раствора Хенкса коммерческого, $\text{pH} = 7,2-7,4$).

55.5. Ход исследования проводится в несколько этапов: приготовление мазков мокроты или лаважной жидкости, их окраска с последующей микроскопией.

55.6. Приготовление мазков мокроты:

поместить мокроту в центрифужную пробирку;

добавить равное количество муколитика;

полученную смесь быстро перемешать;

поместить в термостат при температуре 37°C на 5–15 минут;

развести смесью формалина и спирта (1:1);

центрифугировать 10 минут при 1500 об/мин.;

слить надосадочную жидкость;

осадок перенести на 4–8 предметных стекол;

осадок нанести на стекло в виде тонкого мазка;

мазок высушить на воздухе.

55.7. Приготовление мазков лаважной жидкости:

поместить лаважную жидкость в центрифужную пробирку;

добавить равное количество 50° спирта и перемешать;

центрифугировать 20 минут при 2500 об/мин.;

слить надосадочную жидкость;

осадок перенести на 4–8 предметных стекол;

осадок нанести на стекло в виде тонкого мазка;

мазок высушить на воздухе.

55.8. Скрининговая окраска по Романовскому–Гимза:

высушенный мазок зафиксировать в смеси Никифорова в течение 10–15 минут;

опустить мазок в сульфатно-уксусный реагент на 10 минут;

промывать проточной водой в течение 5 минут;

высушить мазок на воздухе;

окрашивать 10%-ной краской Романовского – Гимзы в течение 30 минут;

результат: цитоплазма трофозоитов голубоватая, ядро – розовое, внутрицистные тельца имеют фиолетовое ядро;

55.9. окончательная или специфическая окраска толуидиновым синим:

высушенный мазок зафиксировать в 10%-ном растворе формалина;

промыть дистиллированной водой;

опустить мазок в сульфатно-уксусный реагент на 5 минут;

реагент перемешать стеклянной палочкой;

оставить мазок в сульфатно-уксусном реагенте еще на 10 минут;

промыть проточной водой;

высушить мазок на воздухе;

окрашивать 0,15%-ным толуидиновым синим в течение 3 минут;

промыть проточной водой;

высушить мазок на воздухе;

докрашивать в 0,25%-ном растворе водного метанилового желтого в течение 2 минут;

промыть водой;

результат: четко дифференцируется стенка пневмоцист, но не дает представ-

ления о клеточном содержимом; цисты сине – фиолетовые, тканевые элементы и фон – зелено-желтые.

55.10. Окончательная или специфическая окраска по Гомори – Грохоту: высушенные мазки зафиксировать в 10%-ном растворе формалина в течение 5–10 минут;

промыть дистиллированной водой;

быстро подогреть раствор хромовой кислоты в стакане до 65⁰С;

в нагретый раствор быстро погрузить мазки на 1 минут;

промыть дистиллированной водой;

опустить мазки в 1%-ный раствор метабисульфита калия на 1 минуту;

приготовить раствор: 25 мл рабочего раствора серебра + 25 мл дистиллированной воды + 2 мл 5%-ного водного тетрабората натрия + 15 мл диметилсульфоксида;

опустить мазки в приготовленный раствор;

подогреть до 90–95⁰С, пока мазки не станут темно-коричневыми, а раствор светло-серым;

прополоскать мазки в трех сменах дистиллированной воды;

опустить мазки в 0,2%-ный водный раствор тиосульфата соды на 1 минуту;

промыть дистиллированной водой;

окрашивать лихтгрюном в течение 5 минут;

промыть дистиллированной водой;

результат: цисты светло- или темно-коричневые (цвет зависит от толщины мазка), округлой или чашеобразной формы, окружающий фон и тканевые элементы зелено-желтые;

55.11. Окраска акридином оранжевым:

высушенные мазки зафиксировать в абсолютном метаноле в течение 2 минут;

окрашивать рабочим раствором акридина оранжевого 10 минут;

промыть дистиллированной водой;

высушить окрашенные мазки на воздухе;

микроскопировать под масляной иммерсией (объектив x90 или x100, окуляр x7 или x10).

ГЛАВА 12

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЧИ

56. Микроскопические исследования мочи.

56.1. Осуществляется двумя методами:

методом концентрации согласно п.57. и методом фильтрации согласно п.58.

56.2. Необходимое оборудование:

центрифужные пробирки;

стеклянные палочки;

пипетки;

предметные стекла;

центрифуга;

микроскоп.

57. Метод концентрации.

57.1. Применяется как специальный метод диагностики мочевого шистосомоза.

57.2. Ход исследования:

всю разовую порцию мочи отстаивать в высоких банках или цилиндрах в течение 30 – 45 минут;

слить верхнюю часть, оставив 10–15 мл осадка, который перелить в центрифужные пробирки;

оставшуюся часть центрифугировать в течение 5 минут при 1500 об/мин. или 1–2 минуты при 3000 об/мин.;

слить надосадочную жидкость;

осадок перенести пипеткой на предметное стекло;

микроскопировать без покровного стекла (объектив x8 или x10, окуляр x10).

57.3. Эффективен при диагностике мочевого шистосомоза и диоктофимоза (редко встречаемая инвазия почечных лоханок); у девочек и женщин в моче иногда можно обнаружить яйца остриц (смываемые мочой с промежности).

58. Метод фильтрации.

58.1. Применяется для диагностики мочевого шистосомоза.

58.2. Ход исследования:

5–10 мл мочи от порции, собранной с 11 ч утра до 15 ч дня, или все порции суточной мочи смешивают с равным количеством детергента–типола;

фильтруют под вакуумом через фильтровальную бумагу (или фильтры №1);

на увлажненных фильтрах обнаруживают яйца и личинки гельминтов при микроскопии.

58.3. Микроскопируют при увеличении: объектив x8 или x10, окуляр x10.

58.4. Эффективен при слабой шистосомозной инвазии.

ГЛАВА 13

ЛАРВОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭПИДЕРМИСА КОЖИ

59. Ларвоскопическое исследование эпидермиса кожи.

59.1. Включает два метода: метод исследования нативного препарата согласно п.60. и метод «обогащенного» препарата согласно п.61.

59.2. Применяется при диагностике онхоцеркоза, кожного дипеталонематоза (стрептоцеркоза).

59.3. Необходимые материалы и оборудование:

физиологический раствор;

стерильные иглы;

стерильное лезвие бритвы или глазной скальпель;

стерильные чашки Петри;

физиологический раствор;

предметные и покровные стекла;

микроскоп.

59.4. Подготовка к работе:

кончиком иглы приподнимают эпидермис кожи и лезвием бритвы или острым глазным скальпелем срезают кусочек кожи диаметром 2–3 мм (бескровно, соблюдая правила асептики);

делают одновременно несколько срезов, главным образом с тех участков, на которых заметны изменения кожи и отмечается зуд (чаще в области гребешков подвздошной кости, боковых поверхностей грудной клетки);

помешают в стерильную чашку Петри с физраствором.

60. Метод исследования нативного препарата.

60.1. Ход исследования:

биоптат эпидермиса кожи помещают на предметное стекло в каплю изотонического раствора хлорида натрия;

микроскопируют сразу после приготовления препарата (объектив x8 или x10, окуляр x10).

60.2. Из положительных препаратов в дальнейшем можно приготовить постоянные препараты путем высушивания, фиксации метанолом и окраски по Романовскому-Гимза.

61. Метод «обогащенного» препарата.

61.1. Ход исследования:

срезы кожи помещают в пробирку с физраствором или средой с коллагеназой и оставляют при температуре 24–37⁰С на 24–36 часа;

надосадочную жидкость сливают;

осадок переносят на предметное стекло и микроскопируют (объектив x8 или x10, окуляр x10).

61.2. Эффективен при диагностике онхоцеркоза, кожного дипеталонематоза (стрептоцеркоза); менее эффективен при кожных поражениях типа линейного дерматита, вызываемых мигрирующими личинками нематод, шистосом и др.

ГЛАВА 14

ЛАРВОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

62. Ларвоскопическое исследование мышечной ткани.

62.1. Применяется для диагностики трихинеллеза путем выявления в мышечной ткани личинок гельминта.

62.2. Материал для исследования: поперечно-полосатая мышечная ткань, кроме мышцы сердца.

62.3. Необходимое оборудование:

стеклянный компрессорий или предметные стекла (размером 12x6 или 15x8 см);

стереоскопический микроскоп МБС;

препаравальные иглы;

термостат;

ножницы, скальпель;

измельчитель ткани;

эмалированные кюветы;

химические стаканчики;

чашки Петри;

пипетки.

62.4. Включает два метода: компрессорной трихинеллоскопии согласно п.63. и переваривания в искусственном желудочном соке согласно п.64.

63. Компрессорная трихинеллоскопия:

63.1. Ход исследования:

каждую пробу мышц перед исследованием помещают в чашки Петри, расположенные на эмалированных кюветах, куда помещают и необходимый инструментарий (ножницы, пинцеты, препаровальные иглы), предметные стекла (работа проводится в перчатках с соблюдением правил техники безопасности);

из каждой пробы мышц (от одного больного) ножницами делают срез строго вдоль мышечных волокон, величиной с «овсяное зерно». Всего из разных участков пробы делают 24 среза, а при отрицательных результатах в 3–4 раза больше;

каждый срез помещают на отдельный квадрат нижнего стекла компрессория (всего в компрессории 24 квадрата) и сдавливают верхним стеклом, путем завинчивания закрепляющих винтов компрессория;

при отсутствии компрессория срезы помещают на большое предметное стекло, причем на значительном расстоянии друг от друга, чтобы во время сдавливания они не сливались; накрывают сверху покровным стеклом меньших размеров и сдавливают до толщины папиросной бумаги.

63.2. Микроскопируют все срезы (каждый срез в отдельности) применяя стереоскопический микроскоп МБС с увеличением: объектив $\times 2$ или $\times 4$, окуляр $\times 12$; $\times 14$; $\times 14,5$.

63.3. Обеззараживание исследовательского материала и лабораторного оборудования:

при обнаружении в мышцах хотя бы одной личинки трихинелл все пробы мышц утилизируют, заливая или засыпая перед этим дезинфектантами: 10%-ным раствором лизола А, сухой хлорной известью или белильной термостойкой известью; или обрабатывают водяным насыщенным паром под давлением $1,5 \text{ кгс/см}^2$ ($0,15 \text{ МПа}$) $126 \pm 2^\circ\text{C}$;

инструментарий и лабораторная посуда обезвреживаются кипячением в течение 60 мин (с момента закипания) или автоклавируются при вышеуказанном режиме.

63.3. Причины, затрудняющие диагностику трихинеллеза:

срезы толстые,

кусочки мышц подсохли,

в срезах обильные включения жира,

пробы мышц фиксированы формалином,

личинки находятся в обызвествленных капсулах.

63.4. Пути устранения причин, указанных в пункте 63.3.:

срезы мышц помещают в 5%-ный раствор едкой щелочи и выдерживают в течение 1 часа при комнатной температуре или 10 минут в термостате при температуре 45°C ;

срезы с обызвествленными капсулами, в которых личинки невидны, помещают предварительно в 5–10%-ный раствор соляной кислоты на 1–2 часа, чтобы растворить известь, затем помещают в глицерин или молочную кислоту для просветления.

63.5. Результат микроскопирования:

инкапсулированная личинка трихинелл в мышцах представляет собой капсулу личинки лимоновидной или овальной формы; размер $0,5\text{--}0,7 \times 0,2\text{--}0,3 \text{ мм}$; внутри капсулы одна, реже две или три спиралевидно свернутых личинки;

при бескапсульном варианте обнаруживаются только спиралевидно свернутые личинки;

63.6. Эффективность метода:

эффективен при высокой и средней интенсивности трихинеллезной инвазии;

эффективность метода может быть повышена за счет увеличения количества исследуемых мышечных срезов до 72–96, т.е. в 3–4 раза.

64. Трихинеллоскопия методом переваривания в искусственном желудочном соке.

64.1. Реактивы:

соляная кислота концентрированная (или 1%-ная для 2-го варианта прописи);
медицинский пепсин кристаллический (или 3%-ный для 2-го варианта прописи);
дистиллированная вода.

64.2. Приготовление раствора искусственного желудочного сока по одной из прописей:

1 л дистиллированной воды + 7 мл 1%-ного раствора соляной кислоты + 5мл 3%-ного раствора пепсина;

1 л дистиллированной воды + 7 мл концентрированной соляной кислоты + 5–7 г пепсина кристаллического.

64.3. Ход исследования:

предварительно измельченную до состояния фарша мышечную ткань помещают в химический стакан с желудочным соком из расчета 10 частей искусственного желудочного сока на 1 часть мышечной массы (например: на 100 мл желудочного сока – 10 г мышечного фарша) и тщательно размешивают;

помещают в термостат при температуре 37⁰С на 16–18 ч, периодически помешивая стеклянной палочкой;

после переваривания всю массу помещают в аппарат Бермана, на сито из мельничного газа (№ 26);

через 1,5–2 ч все личинки оседают на дно пробирки, пробирку снимают, отсасывают верхний надосадочный слой пипеткой;

осадок переносят в чашку Петри или на предметные стекла и микроскопируют под стереоскопическим микроскопом МБС (объектив х2 или х4, окуляр х12 или х14).

64.4. При использовании 2-го варианта прописи желудочного сока реакция ускоряется и ход проведения методики меняется:

фарш помещают в пробирку с желудочным соком (в соотношении 1:25 или 1:50) и ставят в термостат при температуре 42–47⁰С на 3,5 часа;

личинки осаждают в химическом стаканчике емкостью 50 мл в течение 20–30 минут;

надосадочную жидкость сливают, а осадок микроскопируют в чашке Петри с использованием стереоскопического микроскопа МБС (окуляр х12, х14, х14,5; объектив х2, х4);

непереваренные мышечные волокна можно окрасить 0,25%-ным раствором бриллиантового зеленого: будут хорошо видны недекапсулированные личинки трихинелл.

64.5. Эффективность метода:

при низкой интенсивности инвазии более эффективен чем метод компрессорной трихинеллоскопии.

ГЛАВА 15

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОСТНОГО МОЗГА, СОДЕРЖИМОГО КОЖНЫХ ЯЗВ И БУГОРКОВ НА ЛЕЙШМАНИИ

65. Микроскопическое исследование костного мозга, содержимого кожных язв и бугорков на лейшмании.

65.1. Материал для исследования: костный мозг, язвенный краевой инфильтрат, содержимое кожных бугорков.

65.2. Включает в себя: метод мазка из кожного инфильтрата согласно п.66. и метод мазка костного мозга согласно п.67.

66. Метод мазка из кожного инфильтрата.

66.1. Применяется для диагностики кожного лейшманиоза.

66.2. Отбор материала для исследования:

бугорок или участок инфильтрата протирают ватным спиртовым тампоном; стерильным скальпелем делают поверхностный надрез кожи (при этом сдавливают пальцами бугорок для обескровливания);

со дна и краев надреза этим же скальпелем берется соскоб пораженной ткани (в случае появления крови при разрезе, ее удаляют стерильным марлевым тампоном).

66.3. Ход исследования:

соскоб со скальпеля быстро перенести на предметное стекло и равномерно растереть (готовят несколько мазков);

приготовленные мазки высушить на воздухе;

фиксировать метанолом или в смеси Никифорова;

окрашивать по Романовскому (как мазки крови на малярию);

микроскопировать с масляной иммерсией (объектив x90 или x100; окуляр x7 или x10).

66.4. Результат:

лейшмании обнаруживаются в макрофагах, а также вне клеток в виде округлых, овальных или удлинённых телец размером 3–5 мкм; цитоплазма лейшманий светло-голубого или синеватого цвета, ядра – красно-фиолетовые; кинетопласт – окрашен интенсивнее ядра;

в правильно приготовленном препарате хорошо различимы клетки инфильтрата (макрофаги, эндотелиальные, плазматические, лимфоидные клетки, фибробласты и небольшая примесь клеток периферической крови);

наличие в препарате эпителиальных клеток, а также бесструктурных глыбок, окрашивающихся в равномерно сиреневый цвет, означает, что соскоб был взят слишком поверхностно и должен быть повторен;

лейшмании легко обнаруживаются в бугорках и в краевом инфильтрате язвы на начальных стадиях изъязвления; в гнойном отделяемом язвы могут быть обнаружены лишь деформированные и разрушающиеся лейшмании (по которым трудно поставить диагноз); на стадии заживления в пораженных тканях лейшмании обнаруживаются редко; при туберкулоидном лейшманиозе в бугорках обнаруживаются с трудом.

67. Метод мазка костного мозга.

67.1. Применяется для диагностики висцерального (внутреннего) лейшманиоза.

67.2. Ход исследования:

материал, полученный при пункции костного мозга, немедленно (после взятия) перенести на предметное стекло;

очень осторожно, чтобы не деформировать клетки, распределить при помощи шлифованного стекла тонким слоем;

если пунктат плотный, то мазок можно сделать по принципу «отпечатков»,

держа комочек пунктата пинцетом или иглой, или прикасаясь к нему предметным стеклом;

мазок высушить на воздухе и зафиксировать (в абсолютном этиловом спирте или в смеси Никифорова 30 минут, в метиловом спирте – 5 минут);

после очередной просушки на воздухе окрашивать краской по Романовскому (рабочий раствор готовится непосредственно перед окраской и на буферном растворе $pH = 6,9-7,1$) 30–50 минут;

промыть дистиллированной водой и высушить на воздухе;

микроскопировать с масляной иммерсией (объектив $\times 90$ или $\times 100$, окуляр $\times 7$ или $\times 10$).

67.3. Результат: лейшмании обнаруживаются в макрофагах или внеклеточно; они имеют вид округлых, овальных или рисовидных телец диаметром 3–5 мкм; цитоплазма окрашена в серовато–голубой цвет, ядро – в красно–фиолетовый; в цитоплазме имеется кинетопласт в виде округлого или палочковидного образования и окрашивается более интенсивно, чем ядро;

иногда принимают за лейшмании кровяные пластинки или «осколки» клеток (комочки цитоплазмы, содержащие ядерное вещество);

в редких случаях источником ошибки при микроскопии могут служить посторонние микроорганизмы (дрожжевые грибки, одноклеточные водоросли), которые могут попасть со стенок посуды – в мазке они окрашиваются более интенсивно (темно–синяя цитоплазма и ярко–малиновое ядро) и кинетопласт отсутствует;

67.4. При висцеральном лейшманиозе есть вероятность обнаружения паразитов и в периферической крови; в отдельных случаях для диагностики висцерального лейшманиоза исследуют пунктаты селезенки, печени и лимфатических узлов.

ГЛАВА 16

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНИКИ МИКРОСКОПИРОВАНИЯ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ НА ЯЙЦА, ЛИЧИНКИ ГЕЛЬМИНТОВ И ЦИСТЫ ПРОСТЕЙШИХ

68. Важным условием успешного микроскопирования является регулирование света с помощью конденсора и других приспособлений светорегуляции: например, полностью опущенный конденсор обеспечивает максимальную контрастность, полностью поднятый конденсор обеспечивает максимальную яркость изображения. При исследовании на яйца гельминтов желательна большая контрастность, при исследованиях на простейшие необходимо обеспечить достаточную яркость изображения.

69. Поле зрения микроскопа при малом увеличении не должно быть слишком ярким (конденсор опустить вниз или уменьшить освещение), т. к. яйца гельминтов с прозрачной оболочкой могут остаться незамеченными. Это касается и простейших.

70. Во время просмотра препаратов при малом увеличении конденсор микроскопа опускают вниз, что уменьшает освещенность поля зрения и повышает четкость исследуемого материала. Переводя объектив на большое увеличение ($\times 40$), конденсор поднимают, что усиливает освещенность поля зрения.

71. Яйца и личинки в препарате могут находиться внизу, на поверхности и в толще капли (мазка), поэтому препарат просматривают по вертикали на всех уровнях. При этом очень важно отработать определенный автоматизм: одной рукой фиксировать и передвигать предметное стекло, а другой постоянно, плавно вра-

шать винт макро– и микронаводки то в одну, то в другую сторону, чтобы исследовать всю толщину препарата.

72. Начинают исследовать препарат с правого или левого края предметного стекла, зигзагообразно, как при исследовании мазка крови, при этом препарат перемещают на одно поле зрения. Микропрепарат просматривают полностью, даже если были находки уже в первых полях зрения, т.к. может быть смешанная инвазия.

73. При гельминтоооскопии лучше использовать объектив х8, х10 и х40, окуляр х7 и х10 (поиск яиц ведется при малом увеличении, морфологическое строение и идентификация проводятся при большом увеличении); при протозооскопии работают с объективом х40 и окуляром х10.

74. При работе с микроскопом «БИОЛАМ» лучше пользоваться естественным дневным освещением или светом от ламп дневного освещения (настольных, настенных). В микроскопах «БИМАМ» (или импортных марок типа «Leica», «Zeiss») используется свет от вмонтированного электрического осветителя, при этом матовое стекло должно быть вставлено перед конденсором микроскопа.

75. Лаборанту начинать микроскопировать необходимо на микроскопе одной и той же марки, где он изучает не только морфологическое строение яиц гельминтов, но и учится визуально без измерительных приборов соизмерять величину обнаруженных объектов (яиц гельминтов, цист простейших и т.д.). При использовании одних и тех же увеличений микроскопы разных марок (разных фирм–производителей) дают разные размеры объектов, что может привести к диагностическим ошибкам.

76. Для исследования на личинки гельминтов можно использовать микроскоп стереоскопической системы МБС (увеличение: объектив х12, х14, окуляр х2).

77. При идентификации яиц личинок гельминтов, а также протозойных объектов можно использовать микрометрический метод диагностики. Измерения яиц гельминтов под микроскопом можно проводить с помощью окуляр–микрометра, но предварительно для каждого микроскопа и для тех увеличений, с которым работает исследователь, нужно определить значение одного деления окулярной линейки в микронах.

ГЛАВА 17

МИКРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ПРОТОЗОО– И ГЕЛЬМИНТОСКОПИИ

78. Микрометрический метод протозоо- и гельминтоскопии.

78.1. Позволяет осуществлять проведение прямых измерений величины объекта, не требует сложных расчетов, дорогой аппаратуры, доступен для лабораторий разного уровня.

78.2. Применяется:

для уточнения видовой принадлежности паразитарных объектов на основе размера – одного из основных морфофункциональных критериев видовой характеристики паразита;

для дифференциальной диагностики псевдопаразитарных образований.

78.3. Необходимое оборудование:

микроскоп с невидимым набором окуляров и объективов;

окуляр–микрометр со шкалой, разделенной на миллиметровые интервалы с дополнительными делениями – штрихами;

объект–микрометр (линейка на стекле длиной 1 мм, значение величины одного

деления 0,01 мм или 10 мкм).

78.4. Подготовка к работе:

определить до начала наблюдения значение цены одного деления шкалы окуляр-микрометра для каждой применяемой комбинации объектив – окуляр (следует помнить, что величина деления окуляр-микрометра меняется в зависимости от длины тубуса и увеличения окуляра и объектива используемого микроскопа);

поместить объект-микрометр на предметный столик микроскопа и сфокусировать окуляр на линейке объект-микрометра так, чтобы шкала делений стала резкой;

заменить простой окуляр на окуляр-микрометр, с которым предстоит выполнять измерения объекта, и удостовериться, что деление линеек окуляра и объект-микрометра расположены в одной плоскости;

при малом увеличении объектива совместить шкалы линеек окуляр-микрометра и объект-микрометра параллельно друг под другом;

выделить (найти) такое положение линеек, где определенное число делений окуляр-микрометра полностью совпадает с целым числом делений объект-микрометра;

определить цену одного деления окуляр-микрометра: число интервалов на линейке объект-микрометра (Y), строго соответствующий целому числу делений окуляр-микрометра, умножить на 10 мкм и затем разделить на число совпадающих делений шкалы окуляр-микрометра (X), т.е. цена одного деления шкалы окуляр-микрометра в данной оптической системе определяется по формуле ($10 \times Y : X$);

аналогичным образом определить цену деления шкалы окуляр-микрометра для всех объективов микроскопа, с которыми предполагается проводить микроскопические исследования;

при особо ответственных исследованиях проверять цену деления окуляр-микрометра при смене объективов даже в пределах одного типа.

78.5. Ход измерения объекта:

выбрать соответствующий окуляр и объектив для работы (измерение протозойных объектов, также как и яиц гельминтов, для получения более точных данных следует проводить при увеличении в 300–400 раз);

сфокусировать систему объектив-окуляр на объекте, который должен быть измерен;

заменить простой окуляр на окуляр-микрометр;

определить число делений (интервалов) шкалы окуляр-микрометра, покрывающих длину и (или) ширину измеряемого объекта;

определить действительный размер объекта путем умножения полученного числа на значение цены деления шкалы окуляр-микрометра при данной системе объектива и окуляра.

78.6. Во избежание необходимости при каждом измерении умножать полученное число на значение цены одного деления окуляр-микрометра, можно заранее составить таблицу, в которой вычислены значения 1,2,3 и т.д. делений окуляр-микрометра.

Приложение 1
к Инструкции 4.2.11-19-9-2004
«Паразитологические методы
лабораторной диагностики гельминтозов
и протозоозов»

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ
Таблица 1

Материал для исследования	Метод исследования	Применяется для диагностики заболеваний
1	2	3
Фекалии	толстый мазок по Като и Миура	описторхоз, клонорхоз, фасциолез, дикроцелиоз, метагонимоз, нанофитоз, дифиллоботриоз, гименолепидоз, аскаридоз, трихоцефалез, дипилидиоз, анкилостомидозы
	седиментация	описторхоз, клонорхоз, фасциолез, дикроцелиоз, метагонимоз, нанофитоз, дифиллоботриоз, гименолепидоз, аскаридоз, трихоцефалез, анкилостомидозы, строигилоидоз, трихостронгилез, некатороз, шистосомоз, кишечные протозоозы (лямблиоз, криптоспоридиоз, изоспороз)
	флотация	аскаридоз, трихоцефалез, анкилостомидоз, трихостронгилез, некатороз, гименолепидоз, дифиллоботриоз, тениидозы
	Бермана и его модификации	стронгилоидоз, трихостронгилез, анкилостомидоз, некатороз, балантидиаз
	нативый мазок с физраствором и раствором Люголя	лямблиоз, балантидиаз, амебиаз, инфекции вызванные диентамебой, бластоцистоз
	окрашенный мазок по Романовскому и др.	криптоспоридиоз
Перианальный соскоб	Торгушина, Кеворковой, Грэхэм, Рабиновича	тениаринхоз, тениоз, зитеробиоз
Дуоденальное содержимое	микроскопия осадка	описторхоз, клонорхоз, фасциолез, дикроцелиоз, стронгилоидоз, трихостронгилез, анкилостомидоз, некатороз, лямблиоз, изоспороз, криптоспоридиоз
Моча	микроскопия осадка	шистосомоз, диоктофимоз
Мокрота	микроскопия осадка	парагонимоз, томинксоз
	микроскопия окрашенных мазков по Цилу-Нильсену и др.	пневмоцистоз, криптоспоридиоз
Пунктаты, срезы кожи и патматериал		личиночные стадии: эхинококкозы, трихинеллез, цистицероз, филяриитозы, амебиаз, балантидиаз
Костный мозг		лейшманиозы
Биопсированная поперечно-полосатая мускулатура	трихинеллоскопия	трихинеллез

1. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. Возбудители гельминтозов и протозоозов относятся к патогенным биологическим агентам (далее - ПБА) 3 и 4 групп патогенности, что определяет режим работы паразитологических лабораторий (подразделений), выполняющих диагностические, производственные или экспериментальные работы с ПБА.

2. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

2.1. Паразитологические исследования биологического материала от людей на паразитарные заболевания, санитарно-паразитологические исследования объектов внешней среды и пищевых продуктов на цисты патогенных простейших, яйца и личиночные формы гельминтов проводятся в лабораториях (подразделениях), лицензированных или аккредитованных в установленном порядке на данный вид деятельности.

2.2. При отсутствии аккредитации и лицензии паразитологические исследования проводятся по договорам с лабораториями других организаций и учреждений, аккредитованными в установленном порядке.

2.3. Для проведения лабораторных паразитологических исследований допускается только метрологически аттестованные методики.

2.4. Отбор проб для паразитологических исследований проводится в соответствии с требованиями государственных стандартов и инструктивно-нормативных документов, утвержденных Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

3. ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РАЗМЕЩЕНИЮ, НАБОРУ ПОМЕЩЕНИЙ, ОБОРУДОВАНИЮ ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

3.1. Паразитологическая лаборатория может быть расположена в отдельно стоящем здании или специально приспособленной части здания. Допускается размещение на первом этаже в изолированной части здания с отдельным входом.

3.2. Должно быть два входа: для сотрудников и для доставки материала на исследование, но допускается и наличие одного входа при условии передачи материала через передаточное окно.

3.3. Лаборатория должна размещаться в хорошо освещенных комнатах. Не допускается размещение в цокольных и подвальных этажах. На первом этаже нельзя размещать, если имеется затемнение окон деревьями или постройками. При ориентации окон рабочих комнат на юг необходимо обеспечить защиту рабочих столов и оптики от прямого попадания солнечного света путем использования жалюзи из материала, устойчивого к дезинфицирующим средствам.

3.4. Лаборатория должна иметь вентиляцию, канализацию, отопление, водопровод, искусственное и естественное освещение (в соответствии с действующими нормативными документами).

3.5. Площадь рабочей комнаты принимается из расчета на бригаду (не менее 2 рабочих мест) и оборудование, т.е. не менее 16–18 м².

3.6. Лаборатория должна иметь набор рабочих комнат, в соответствии с производственной мощностью и номенклатурой исследований. Выделяются отдельные лабораторные комнаты для работы с биологическим материалом, для санитарно-паразитологических исследований и серологических исследований.

3.7. В отдельных случаях допускается совмещение в одной лабораторной комнате исследований биологического материала и санитарно-паразитологических исследований, но при условии организации рабочих мест на каждый вид исследований и соблюдения норм площади на каждое рабочее место. А также разделение движения инвазионного и чистого материала во времени.

3.8. В лаборатории должна обеспечиваться «поточность», т.е. деление на «чистую» (врачебная, гардероб, кладовая, комната приема пищи и другие подсобные помещения) и «заразную» (приема материала; подготовки проб; моечная; стерилизационная или автоклавная для обеззараживания; термостатная; комната для проведения исследований) половины.

3.9. Если паразитологическая лаборатория размещена отдельно, то моечная может быть совмещена со стерилизационной и комнатой для подготовки проб.

3.10. Комнаты для подготовки проб, приготовления химреактивов, варки солевых растворов должны быть оборудованы вытяжной вентиляцией (приточно-вытяжного или вытяжного типа через общую вытяжную сеть или индивидуально через окно, с выводной трубой выше здания). Вследствие использования при выполнении методик летучих и легко воспламеняющихся веществ (эфир, кислоты и т.д.) не разрешается совмещение вентиляции паразитологических лабораторий с лабораториями, где используется обжиг или муфельные печи.

3.11. При размещении в одном блоке нескольких профильных лабораторий общими для них могут быть: гардеробная, комната приема материала, моечная, стерилизационная, автоклавная, врачебные комнаты, комната приема пищи и другие подсобные помещения. При этом площадь помещений должна быть увеличена.

3.12. Лабораторные комнаты оборудуются раковинами для мытья рук, в моечной – для мытья посуды.

3.13. Стены облицовывают на 1,5 метра от пола кафельной плиткой или другими современными строительными материалами, которые поддаются мойке и дезинфекции или окрашиваются масляной краской.

3.14. Полы покрываются линолеумом, релином или плиткой для пола (не должны быть скользкими).

3.15. Лабораторные столы используются с пластиковым покрытием или другим покрытием, легко поддающимся дезинфекционной обработке.

4. РЕЖИМ И ПРАВИЛА РАБОТЫ С ИНВАЗИОННЫМ МАТЕРИАЛОМ

4.1. Работу с ПБА 3–4 групп патогенности выполняют специалисты с высшим и средним специальным образованием, прошедшие специализацию по лабораторной диагностике гельминтозов и протозоозов.

4.2. Персонал лаборатории допускается к работе после проведения инструктажа по соблюдению требований биологической безопасности.

4.3. Приборы, оборудование и средства измерения в лаборатории должны быть аттестованы, технически исправны, проходить метрологический контроль в установленные сроки и иметь технический паспорт. Количество оборудования в лаборатории определяется объемами и характером проводимых и планируемых (со-

гласно номенклатуре) паразитологических исследований.

5. ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ МАТЕРИАЛА И ДЕЗИНФЕКЦИЯ ПОМЕЩЕНИЙ

5.1. Банки с фекалиями, желчью, мокротой и т.п. помещают в эмалированные кюветы или на отдельные столы стационарные или передвижные (с пластиковым или другим легко поддающимся дезинфекции покрытием).

5.2. Пробирки с кровью устанавливают в штативы, помещенные в эмалированные, пластиковые кюветы.

5.3. При отсутствии пластикового покрытия на столах для микроскопии используют легко поддающиеся дезинфекции стеклянные, металлические, пластиковые пластины или эмалированные кюветы, где раскладывают мазки, препараты, материал для исследования.

5.4. Отработанные предметные стекла, пипетки, пробирки, пробки, стеклянные палочки, химические стаканчики и т.п. складывают в течение рабочего дня в емкости с дезинфицирующим раствором до полного вертикального погружения (10%-ный хлорамин, «Велтолен», «Аламинаг», дезсредства типа «Септодор», «Дианокс», «Виркон» и т.д., допущенные к применению в установленном порядке) для предварительного обеззараживания.

5.5. Заключительное обеззараживание лабораторной посуды проводится путем кипячения в воде (с момента закипания не менее 30 минут) с добавлением хозяйственного мыла или жидкого моющего средства. При соответствующих условиях можно использовать автоклавирование. После дезинфекции посуда допускается для мытья и стерилизации.

5.6. Ватно-марлевый материал, бумажные фильтры и разовые деревянные палочки уничтожаются путем сжигания или выброса в контейнер для мусора после экспозиции в одном из дезинфицирующих растворов или предварительно засыпаются сухим порошком хлорной извести или хлорамина.

5.7. Пробы фекалий, мокроты, желчи, мочи засыпаются сухой хлорной известью или белильной термостойкой известью или хлорамином перед выбросом в контейнеры или сливом в общую канализационную систему (при соответствующих условиях для обезвреживания используют автоклавирование).

5.8. Полистироловые планшеты, наконечники, микропробирки, пробирки, пипетки и др., используемые при работе с кровью или сывороткой крови, обеззараживаются в 6%-ном растворе перекиси водорода с экспозицией 3 часа в термостате при 50⁰С. После этого промывают под проточной водой, затем промывают 3-5 минут в дистиллированной воде и высушивают в термостате при 50⁰С в течение 15 минут.

5.9. Сгустки крови и сыворотку крови перед утилизацией в общую канализационную сеть обезвреживают только с применением дезинфицирующих растворов (в соответствии с действующими инструкциями по обеззараживанию).

5.10. Рабочие поверхности лабораторных столов обеззараживают 70%-ным спиртом с последующим фламбированием.

5.11. Дезинфекционная обработка оборудования (центрифуги, микроскопы, холодильники и др.) проводится раствором 70%-ного спирта или с применением соответствующих дезсредств.

5.12. Дезинфекция халатов и полотенец проводится методом кипячения.

5.13. Текущая уборка лабораторных помещений проводится ежедневно после

окончания рабочего дня влажным способом с применением дезинфицирующих средств, в «чистой» зоне – с применением моющих средств.

5.14. Для мусора используются ведра с педальным приспособлением для поднятия крышек и разовые полиэтиленовые пакеты для мусора.

5.15. Для дезинфекции воздуха лабораторного помещения и поверхностей используются бактерицидные лампы или аэрозольные дезинфицирующие вещества.

6. ЛИЧНАЯ ГИГИЕНА ЛАБОРАНТА

6.1. Работа с фекалиями, желчью, мокротой, кровью и другим биологическим материалом от людей проводится обязательно в резиновых перчатках, особенно в период подготовки материала и ходе его исследования.

6.2. Обработка рук после работы с инвазионным материалом заключается в предварительном мытье рук с мылом под проточной водой, затем обработка ватным тампоном с 70%-ным спиртом (можно использовать дезсредства для гигиенической и хирургической обработки рук).

6.3. При длительной микроскопии лаборанту для профилактики утомляемости глаз необходимо делать зарядку:

попеременно прикрывая рукой (руки перед этим тщательно моются) один глаз, другим смотреть вдаль – на деревья, строения, дома за окном;

прикрыть глаза, положить пальцы рук на веки и слегка надавить; затем, преодолевая сопротивление пальцев, посмотреть вверх, вниз, направо и налево (повторить 6-8 раз);

быстро-быстро поморгать;

потянуться нижней губой к носу для лучшего оттока венозной крови из глаз;

очень мягко, осторожно подушечками пальцев круговыми движениями помассировать глазные яблоки через веки;

дотронуться до слезных косточек у переносицы и помассировать; переместить пальцы к наружным уголкам глаз и также помассировать;

посидеть расслабленно около минуты; сжать кулаки, напрячь плечи, руки, потянуться всем телом, отряхнуться и снова можно приступить к микроскопированию (работа с микроскопом у лаборанта не должна занимать более 60% рабочего времени за день).

6.4. Перед выходом из лабораторного помещения рабочий халат снимается; лабораторный халат и сменная обувь хранятся в шкафу отдельно от личной одежды.

7. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА СОБЛЮДЕНИЕ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОГО РЕЖИМА В ЛАБОРАТОРИИ

7.1. Соблюдение правил дезинфекции, техники безопасности при работе с инвазионным и подозрительным на содержание возбудителей паразитарных болезней материалом обязательно для всех сотрудников лаборатории.

7.2. Текущий контроль за выполнением требований техники безопасности осуществляет руководитель лаборатории.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая инструкция подготовлена на основе Методических указаний МУК 4.2.735-99 «Паразитологические методы лабораторной диагностики гельминтозов и протозоозов», утвержденных Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 25 февраля 1999 г.

2. Адаптирована специалистами ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» (А.Л. Веденьков, Ф.М. Фидаров), ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» (д.б.н. Л.В. Скрипова), ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии» (Л.И. Карпук, В.Б. Павлюченко).

3. Утверждена постановлением Первого заместителя Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 03 мая 2004 г. № 49.

4. Введена впервые.