

Методики лабораторных исследований

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКОБАКТЕРИЙ МЕТОДОМ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ЧАСТЬ 1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ОКРАШИВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ

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

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

Поступила 19.06.2019

Изложен метод выявления микобактерий (МБ) с помощью микроскопического исследования препаратов, окрашенных люминесцентным методом.

Описаны варианты приготовления препаратов для микроскопии из осадка диагностического материала, подготовленного для культурального исследования, и из осадка необработанного жидкого материала. Представлены 2 методики окрашивания препаратов люминесцентными красителями. Проведен обзор возможных ошибок при приготовлении и окраске мазков для люминесцентной микроскопии.

Ключевые слова: микобактерии, метод люминесцентной микроскопии.

DOI: 10.7868/S2587667819030105

Laboratory Techniques

DETECTION OF MYCOBACTERIA BY FLUORESCENT MICROSCOPY PART 1. SPECIMEN PREPARATION AND STAINING

Sevastyanova E.V., Larionova E.E., Andrievskaya I.Yu.

Central TB Research Institute, Moscow, Russia

Submitted as of 19.06.2019

The article presents a method of mycobacteria (MB) detection by microscopy examination of specimens stained with fluorescent method; describes options for specimen preparation from sediment of the diagnostic material for culture examinations and from the sediment of untreated liquid specimens; presents two methods of staining with fluorescent dyes. The article also provides an overview of possible errors in smear preparation and staining for fluorescent microscopy.

Keywords: mycobacteria, fluorescent microscopy method.

Для выявления кислотоустойчивых МБ в лабораторной практике используются два метода микроскопического исследования диагностического материала:

- **метод прямой микроскопии**, когда мазок приготавливается непосредственно из необработанного (нативного) диагностического материала или его осадка (в случае жидкого материала);
- **метод микроскопии мазка из обработанного осадка материала**, подготовленного для культурального исследования путем обработки разжижающими и деконтаминирующими средствами и последующего центрифугирования при 3000 г в безопасной центрифуге.

Первый, наименее затратный метод широко применяется в лабораториях, которые проводят только микроскопическое исследование мазков с окраской по методу Циля–Нильсена и исследованием в обычном световом микроскопе проходящего света (клинико-диагностические лаборатории учреждений первичной медико-санитарной помощи).

Второй метод, при выполнении которого обычно проводят окраску мазков люминесцентными красителями, чаще всего используется в бактериологических лабораториях специализированных противотуберкулезных учреждений и является альтернативой унифицированному методу окраски по Цилю–Нильсену [1–3, 5, 7].

Метод люминесцентной микроскопии основан на наблюдении светящихся микроскопических объектов на общем темном фоне препарата. По сравнению с методом световой микроскопии в проходящем свете, он обладает рядом преимуществ: высокой степенью контрастности цветных светящихся объектов на темном фоне, значительно большей площадью просматриваемого поля зрения за счет использования меньших увеличений микроскопа, экономией времени и др.

Метод люминесцентной микроскопии для выявления кислотоустойчивых микроорганизмов (КУМ), также как и метод Циля–Нильсена, основан на проникновении в клетку карболового производного флуоресцентного красителя аурамина О. Производное аурамина имеет ряд преимуществ перед карболовым фуксином при селективной окраске МБ: по-видимому, аурамин более прочно, чем фуксин связывается с клеточными структурами МБ, обеспечивая яркое люминесцентное свечение окрашенной флуоресцентным красителем микобактериальной клетки, что позволяет обнаружить ее при меньшем увеличении микроскопа. Это приводит к большому количеству находок при меньшей затрате времени. По литературным данным, люминесцентная микроскопия для выявления КУМ более эффективна, чем обычная микроскопия проходящего света [1, 5].

Эффективность люминесцентной микроскопии во многом зависит от правильного выполнения процедуры окрашивания и наладки микроскопа. Качественная и эффективная окраска флуорохромными красителями требует обязательного соблюдения кислотности (рН) мазка, а также освобождения МБ от окружающей их слизи, которая препятствует проникновению красителя в микробную клетку. Несоблюдение этих условий приводит к снижению эффективности люминесцентной микроскопии и получению ложноотрицательных результатов исследования. Именно поэтому окраску люминесцентными красителями рекомендуется применять при исследовании мазков, приготовленных из осадка материала, обработанного для культурального исследования и нейтрализованного после деконтаминации. В связи с этим данный метод обычно используется только в бактериологических лабораториях, которые помимо микроскопического, выполняют еще и культуральное исследование, при этом мазок и посев производятся парал-

лельно и обязательно из одной и той же порции материала.

При обработке диагностического материала препарата люминесцентными красителями (карболовое производное флуоресцентного красителя аурамина О и др.), которые связываются с воскоподобными структурами микробной клетки и проникают в ее цитоплазму, последующее облучение препарата возбуждающим источником света (определенный спектр ультрафиолетового излучения) вызывает оранжевое или ярко-желтое свечение окрашенных клеток МБ на черном или темно-зеленом фоне (рис. 1).

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

Поэтому при просмотре одного и того же количества полей зрения в случае люминесцентной микроскопии при использовании увеличения в пределах 630х–200х фактическая площадь просмотренного мазка приблизительно

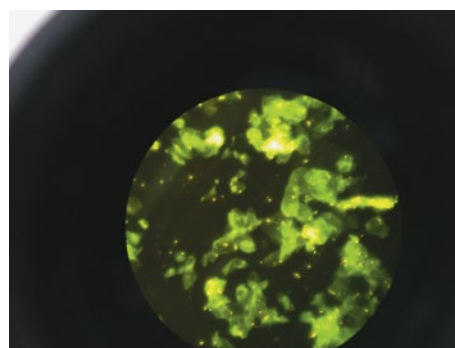


Рисунок 1. Вид под микроскопом кислотоустойчивых микобактерий (идентифицированных впоследствии как *M. tuberculosis*) в препарате из осадка мокроты, окрашенном люминесцентными красителями.

Figure 1. Microscopic view of the acid-fast mycobacteria (subsequently identified as *M. tuberculosis*) in the sputum sediment specimen stained with fluorescent dyes.

но в 2,5–25 раз больше, чем при увеличении в 1000 раз, применяемом при обычной микроскопии проходящего света. Указанная особенность люминесцентной микроскопии существенно сокращает время, необходимое для просмотра мазка. Подсчитано, что если микроскопическое исследование необходимой площади мазка при окраске по Цилю–Нильсену составляет приблизительно 10–15 минут, то для исследования той же площади мазка методом люминесцентной микроскопии потребуется только 2–3 минуты.

Наряду с этим при люминесцентной микроскопии отмечается значительно большая резкость и контрастность микроскопической картины, что повышает комфортность микроскопического исследования. Для глаза исследователя намного легче обнаружить флуоресцирующие оранжевые или ярко-желтые МБ на темном (при гашении фона метиленовым синим или перманганатом калия) или темно-красном (при гашении фона акридиновым оранжевым) фоне, чем выявить красные МБ на ярком голубом фоне клеточного детрита при окраске по Цилю–Нильсену. Это делает метод люминесцентной микроскопии особенно ценным при исследовании олигобациллярного материала. Чувствительность люминесцентной микроскопии, особенно в сочетании с методом обогащения диагностического материала (микроскопия осадка), приближается к чувствительности метода посева.

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

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

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

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МИКРОСКОПИИ

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

Обработка диагностического материала и подготовка осадка проводятся в соответствии со стандартной методикой [3–4]. Процедура подготовки предметных стекол для исследования подробно описана нами ранее [6].

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

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

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

Не следует касаться чистой поверхности стекла руками или перчатками!

Приготовление мазка из осадка диагностического материала, подготовленного для культурального исследования

Культуральное исследование любого диагностического материала обязательно сопровождается параллельным микроскопическим исследо-

ванием осадка, полученного после обработки (деконтаминации и разжижения) материала с последующим центрифугированием и нейтрализацией.

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

Все мазки из осадка приготавливают после выполнения процедуры посева!

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

Последовательность процедуры приготовления мазка из осадка обработанного материала:

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

Мазки из осадка жидких материалов (моча, промывные воды и др.) во избежание смывания материала при окраске желательно приготавливать на стеклах, предварительно обработанных яичным белком (методика приготовления таких стекол изложена нами ранее [6]).

Таким образом, мазок из осадка должен располагаться в центре предметного стекла, занимая площадь не менее 2 × 1 см. Такая площадь мазка вполне достаточна для проведения эффек-

тивного микроскопического исследования и в то же время значительно повышает безопасность манипуляции приготовления мазка, его окраски и последующей микроскопии, так как периферические части и ребра предметного стекла остаются незагрязненными инфекционным материалом. При этом микроскопист, исследующий от 100 до 300 полей зрения, в зависимости от применяемого увеличения просматривает от 1% до 4% площади такого мазка. Это вполне достаточно для обнаружения диагностически значимого количества микобактериальных клеток.

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

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

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

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

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

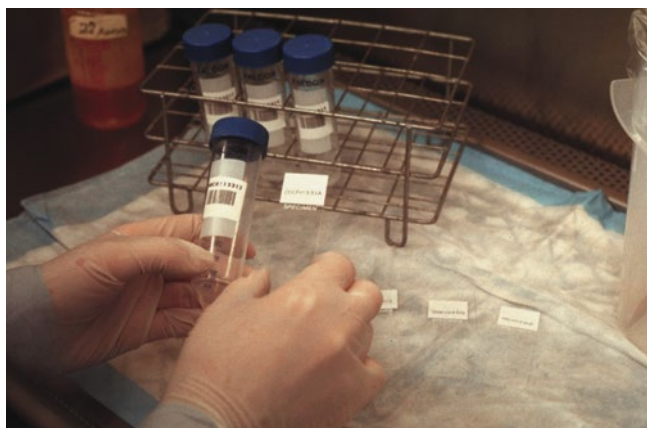


Рисунок 2. Сверка номеров на пробирках с диагностическим материалом и предметных стеклах.

Figure 2. Checking the numbers on the test tubes, diagnostic material and slides.



Рисунок 3. Приготовление мазка из осадка диагностического материала.

Figure 3. Preparation of smears from the sediment of the diagnostic material.

Приготовление мазка из осадка необработанного жидкого материала

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

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

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

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

Фиксация мазка

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

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

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

ОКРАСКА ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Для окраски препаратов флуорохромными красителями необходимо следующее оборудование и реактивы:

- раковина или специальный вместительный лоток для проведения окраски;
 - специальный штатив («рельсы») для окраски мазков на предметных стеклах;
 - пинцет или щипцы для взятия предметных стекол;
 - раствор люминесцентных красителей для окраски кислотоустойчивых МБ;
 - спиртовой раствор соляной кислоты для обесцвечивания мазков после окраски аурамино и родамином;
 - раствор для гашения фона обесцвеченного мазка;
 - емкость с дистиллированной водой для промывания мазков;
 - штатив для просушивания окрашенных стекол на воздухе в вертикальном или наклонном положении;
 - емкость с дезинфицирующим раствором.
- Существует несколько методов окраски МБ люминесцентными красителями. В нашей стране наибольшее распространение получили два метода, которые описаны ниже.

МЕТОД ОКРАСКИ АУРАМИНОМ ОО И РОДАМИНОМ С

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

Реактивы:

- спирт этиловый марки ОП-2, ТУ 6-09-45-12-77 – регистрационное удостоверение 74/614/11;
- кислота соляная концентрированная, ГОСТ 3118-77;
- метиленовый синий хлорид, ТУ 6-09945-75;
- аурамин ОО, *Auramine O*, *Sigma* (№ А9655);
- родамин С, *Rhodamine B*, *Sigma* (№ R6626);
- вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72.

Приготовление растворов

Раствор 1. Раствор аурамина ОО – родамин С:

аурамин ОО	1,0 г
родамин С	0,1 г
вода дистиллированная	1000,0 мл

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

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

Раствор 2. Обесцвечивающий раствор:

этиловый спирт 96% 97,0 мл
концентрированная соляная кислота 3,0 мл
Аккуратно добавить 3 мл концентрированной соляной кислоты к 97 мл этилового спирта.

Всегда осторожно вливайте кислоту в спирт, но не наоборот!

Раствор 3. Гаситель фона:

метиленовый синий хлорид 250,0 мг
вода дистиллированная 100,0 мл
В 100 мл дистиллированной воды растворить 250 мг метиленового синего хлорида.

Хранение растворов

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

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

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

Процедура окраски

Не нагревать мазки и не использовать полочки фильтровальной бумаги!

1) Стекла с фиксированными мазками разложить на специальные штативы (рельсы) для окраски так, чтобы они не касались друг друга, и расстояние между их боковыми краями составляло примерно 1 см.

2) Мазки залить **раствором 1** на **1 час**.

3) Тщательно и аккуратно промыть дистиллированной водой каждое стекло до тех пор, пока не смоются все остатки краски.

4) Обесцветить **раствором 2** (3% солянокислый спирт) в течение **3 минут**.

5) Промыть дистиллированной водой.

6) Гашение фона произвести **раствором 3** в течение **60 секунд**.

7) Аккуратно промыть препарат дистиллированной водой. Если препарат имеет интенсивную синюю окраску, можно повторно очень аккуратно промыть его.

8) Препараты высушивают при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.

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

При приготовлении и окраске мазков люминесцентными красителями необходимо:

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

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

В препарате, окрашенном флуорохромными красителями (аурамин О, родамин С и др.), микробные клетки начинают светиться оранжевым или ярко-желтым светом и становятся видными в виде палочковидных структур на черном или темно-зеленом фоне препарата (рис. 4).

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

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

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

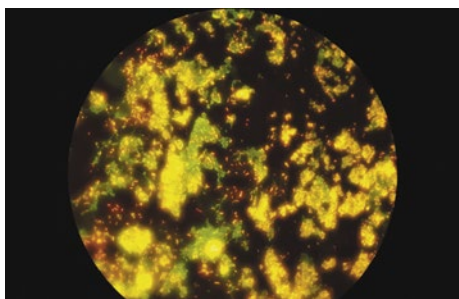


Рисунок 4. Вид под микроскопом кислотоустойчивых микобактерий (идентифицированных впоследствии как *M. abscessus*) в препарате из осадка мокроты, окрашенном аурамин-родамином.

Figure 4. Microscopic view of the acid-fast mycobacteria (subsequently identified as *M. abscessus*) in the sputum sediment specimen stained with auramine-rhodamine.

МЕТОД ОКРАСКИ АУРАМИНОМ О (Hagemann P.K., 1938; CDC, 1985; ВОЗ, 1998)

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

Реактивы:

- спирт этиловый марки ОП-2, ТУ 6-09-45-12-77, 96°;
- кислота соляная концентрированная, ГОСТ 3118-77;
- фенол кристаллический (карболовая кислота), ГОСТ 6417-72;
- аурамин ОО, *Auramine O*, *Sigma* (№ А9655);
- акридиновый оранжевый, *Acridine orange*, *Sigma* (№ А6014);
- перманганат калия, ГОСТ 10163-76;
- вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72;
- безводный двухзамещенный фосфат натрия, ГОСТ 4172-66.

Приготовление растворов

Раствор 1. Спиртовой раствор аурамина О:
аурамин 0,1 г
этиловый спирт 96% 10,0 мл
Растворить аурамин в спирте.

Раствор 2. Раствор фенола:
фенол кристаллический 3,0 г
дистиллированная вода 87,0 мл
Расплавить 3 г кристаллического фенола путем легкого подогревания на водяной бане (температура плавления фенола 41 °С). Затем добавить слегка подогретую дистиллированную воду до общего объема 90 мл.

Раствор 3. Рабочий раствор аурамина:
смешать растворы 1 и 2 и перелить в плотно закрывающуюся емкость из темного стекла.

Раствор 4. Обесцвечивающий раствор:
концентрированная соляная кислота 0,5 мл
технический 70% этиловый спирт 100,0 мл
Аккуратно добавить концентрированную соляную кислоту к спирту.

Всегда осторожно вливайте кислоту в спирт, но не наоборот!

Раствор 5. Гаситель фона:

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

а) Раствор перманганата калия:

перманганат калия (KMnO_4) 0,5 г
дистиллированная вода 100,0 мл
Растворить перманганат калия в дистиллированной воде и перелить в плотно закрывающуюся бутылку из темного стекла.

б) Раствор акридинового оранжевого:

безводный двухзамещенный фосфат натрия (Na_2HPO_4) 0,01 г
дистиллированная вода 100,0 мл
акридиновый оранжевый 0,01 г
Растворить фосфат натрия в дистиллированной воде. Добавить акридиновый оранжевый. Хранить в плотно закрывающейся темной емкости.

Хранение растворов

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

- название находящегося в емкости раствора;
 - дату его приготовления;
 - срок годности приготовленного раствора;
 - фамилию специалиста, готовившего раствор.
- Растворы хранят при комнатной температуре, в темном месте, в течение 3 месяцев, следя за тем, чтобы не образовывался преципитат.

Процедура окраски

Не нагревать мазки и не использовать полочки фильтровальной бумаги!

1) Стекла с фиксированными мазками разложить на специальные штативы (рельсы) для окраски так, чтобы они не касались друг друга, и расстояние между их боковыми краями составляло примерно 1 см.

2) Мазки залить **раствором 3** на **15 минут**.

3) Тщательно, но аккуратно промыть мазки дистиллированной водой.

4) Обесцветить **раствором 4** (0,5% солянокислый спирт) в течение **2 минут**.

5) Промыть дистиллированной водой каждое стекло до тех пор, пока не смоются все остатки краски.

6) Гашение фона произвести **раствором 5 (5а – раствор перманганата калия или 5б раствор – акридинового оранжевого)** в течение **2 минут**.

7) Аккуратно промыть препарат дистиллированной водой.

8) Препараты высушивают при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении.

При использовании перманганата калия время его воздействия не должно превышать 2 минут!

Точность экспозиции имеет решающее значение, так как при передержке интенсивность флуоресценции МБ может уменьшаться.

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Черноусова Л.Н., Севастьянова Э.В., Андреевская С.Н., Ларионова Е.Е., Смирнова Т.Г., Ерохин В.В. Алгоритм микробиологических исследований для диагностики туберкулезной инфекции. Методическое пособие для врачей № УМО-17-28/248 от 12.07.11. – М. – 2011. – 49 с.
2. Голышевская В.И., Севастьянова Э.В., Шульгина М.В., Евгущенко Г.В. Выявление туберкулеза методом микроскопии: Учебное пособие для проведения базового курса обучения «Выявление туберкулеза методом микроскопии» УМО-107, 08.02.07). – М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. – 100 с.
3. Приказ МЗ РФ от 21 марта 2003 года № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». Приложение № 11 «Инструкция по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза».
4. Голышевская В.И., Шульгина М.В., Севастьянова Э.В., Акимкин В.Г., Ванина Г.М., Вахрушева Д.В., Вишневецкий Б.И., Владимирский М.А., Иртуганова О.А., Кравченко М.А., Оттен Т.Ф., Попов С.А., Сафонова С.Г., Федорова Л.С. Культуральные методы диагностики туберкулеза. Учебное пособие для проведения базового курса обучения специалистов бактериологических лабораторий учреждений противотуберкулезной службы, УМО-685, 24.10.07 / под редакцией чл.-корр. РАНН, профессора В.В. Ерохина. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. – 208 с.
5. Голышевская В.И., Егорова О.В., Севастьянова Э.В., Шульгина М.В. Люминесцентная микроскопия: Учебное пособие для проведения курсов обучения: «Культуральные методы диагностики туберкулеза», «Выявление туберкулеза методом микроскопии», УМО-691, 24.10.07. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. – 36 с.
6. Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Андреевская И.Ю. Выявление микобактерий методом микроскопии препаратов, окрашенных по Цилю–Нильсену. Часть 1. Приготовление и окрашивание препаратов для микроскопии // Вестник ЦНИИТ. – 2019. – № 1. – С. 100–108. DOI: 10.7868/S2587667819010114.
7. Черноусова Л.Н., Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Попов С.А., Журавлев В.Ю., Пузанов В.А., Марьяндышев А.О., Вахрушева Д.В., Кравченко М.А., Сафонова С.Г., Васильева И.А., Эргешов А.Э. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. – РОФ. – Москва. – 2015. – 35 с.

REFERENCES

1. Chernousova L.N., Sevastyanova E.V., Andreevskaya S.N., Larionova E.E., Smirnova T.G., Erokhin V.V., Algorithm of microbiological examinations for the diagnosis of tuberculosis infection: Handbook for Doctors. no. UMO-17-28/248 of 12.07.11, M, 2011, p. 49. (In Russ.)
2. Golyshvskaya V.I., Sevastyanova E.V., Shulgina M.V., Evguschenko G.V., TB Detection by Microscopy Method. Textbook for the Basic Training Course «TB Detection by the Microscopy Method» UMO-107, 08.02.07), M., Tver, LLC «Publishing house «Triada», 2008, p. 100. (In Russ.)
3. Executive Order no. 109 of the Russian Ministry of Health of 21 March 2003 «On Improvement of Anti-tuberculosis Measures in the Russian Federation», Annex 11 «Guideline on the Unified Methods of Microbiological Examinations in TB Detection, Diagnosis and Treatment». (In Russ.)
4. Golyshvskaya V.I., Shulgina M.V., Sevastyanova E.V., Akimkin V.G., Vanina G.M., Vakhrusheva D.V., Vishnevsky B.I., Vladimirsky M.A., Irtuganova O.A.,

- Kravchenko M.A., Otten T.F., Popov S.A., Safonova S.G., Fedorova L.S.* Culture methods for TB diagnosis: Manual for the Basic Training of TB Bacteriological Laboratory Specialists, EMA-685, 24.10.07, under the editorship of the RAMS corresponding member prof. V.V. Erokhin, M., Tver, LLC «Publishing house «Triada», 2008, p. 208. (In Russ.)
5. *Golyshevskaya V.I., Egorova O.V. Sevastyanova E.V., Shulgina M.V.* Fluorescent Microscopy, Textbook for Training Courses: Culture Methods of TB Diagnosis, Microscopy Method for TB Detection, UMO-691, 24.10.07, M., Tver: LLC Publishing house Triada, 2008, p. 36. (In Russ.)
6. *Sevastyanova E.V., Larionova E.E., Andrievskaya I.Yu.* Identification of Mycobacteria by Ziehl–Nielsen Smears Microscopy Method. Part 1. Preparation and Staining of Specimens for Microscopy, *CTRI Bulletin*, 2019, no. 1, pp. 100–108. DOI: 10.7868/S25876678190114 (In Russ.)
7. *Chernousova L.N., Sevastyanova E.V., Larionova E.E., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Popov S.A., Zhuravlev V.Yu., Puzanov V.A., Mariandyshev A.O., Vakhrusheva D.V., Kravchenko M.A., Safonova S.G., Vasilyeva I.A., Ergeshov A.E.* Federal Clinical Recommendations for Management and Implementation of Microbiological and Molecular Genetic Diagnosis of Tuberculosis, RSP, Moscow, 2015, p. 35. (In Russ.)

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

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

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

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

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

FOR CORRESPONDENCE:

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

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

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

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