

Методики лабораторных исследований

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКОБАКТЕРИЙ МЕТОДОМ МИКРОСКОПИИ ПРЕПАРАТОВ, ОКРАШЕННЫХ ПО ЦИЛЮ-НИЛЬСЕНУ

Часть 2. Микроскопическое исследование препаратов

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

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

Поступила 11.03.2019

Изложен метод выявления микобактерий (МБ) с помощью микроскопического исследования препаратов, окрашенных по Цилю-Нильсену. Описаны техника и порядок микроскопического исследования, а также морфологические особенности МБ, обнаруживаемых в нативном диагностическом материале и в выросшей культуре. Представлены примеры видов под микроскопом культур микобактерий туберкулеза (МБТ) и нетуберкулезных микобактерий (НТМБ), выросших на жидкой и плотной питательных средах. Проведен анализ возможных ошибок при выполнении процедуры микроскопического исследования мазков.

Ключевые слова: микобактерии, метод Циля-Нильсена

DOI: 10.7868/S2587667819020109

Laboratory Techniques

MICROSCOPIC DETECTION OF MYCOBACTERIA BY ZIEHL-NEELSEN STAINING TECHNIQUE

Part 2. Sputum smear microscopy

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

Central TB Research Institute, Moscow, Russia

Submitted as of 11.03.2019

We have described the microscopic detection of mycobacteria using Ziehl-Neelsen staining of smears. We described the techniques and the algorithm of a microscopic study, as well as morphological traits of mycobacteria detected in native diagnostic samples or grown cultures. We also represented *M. tuberculosis* cultures grown on liquid or solid media as they might be viewed under the microscope. We analyzed possible errors, which could occur during a smear microscopy procedure.

Keywords: mycobacteria, Ziehl-Neelsen microscopy.

Одним из наиболее распространенных видов микроскопического исследования кислотоустойчивых микроорганизмов (КУМ) является световая микроскопия с использованием обычного микроскопа проходя-

щего света. Для исследования препаратов, окрашенных по Цилю-Нильсену, используют световой бинокулярный микроскоп с иммерсионным объективом (100×) и окуляром 7×–10× (рис. 1).



Рисунок 1. Организация рабочего места для микроскопического исследования методом Циля-Нильсена.
Figure 1. A workplace for Ziehl-Neelsen microscopic study.

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ ИЗ НАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Основные принципы метода прямой микроскопии нативных мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену

Как правило, для выявления в мазке единичных КУМ (при их концентрации в мокроте около 5–10 тыс./мл) достаточно исследовать 100 полей зрения. Опытному специалисту потребуется на это приблизительно 5 мин. В мазке площадью 2×1,5 см количество микроскопических полей зрения от края до края составит примерно 100.

При значительном количестве КУМ в каждом из просматриваемых полей зрения (от 1 до 10) допустимо исследовать 50 полей зрения. При обнаружении более 10 КУМ в 1 поле зрения в каждом из просматриваемых полей достаточно просмотреть 20 полей зрения.

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

В полноценном поле зрения должен присутствовать один из следующих элементов: лейко-

циты, альвеолярные макрофаги, эластические волокна и мерцательный эпителий. Поле зрения, не содержащее указанных элементов, не должно быть включено в счет просмотренных полей зрения при просмотре мазка.

Во избежание повторного просмотра одного и того же поля рекомендуется микроскопировать препарат всегда по одной и той же схеме: просмотр 100 полей зрения обеспечивает 1 проход по длине препарата, либо 3 параллельных прохода по его ширине.

Заключение об отрицательном результате исследования препарата может быть сделано после просмотра 300 полей зрения. В этом случае для того, чтобы избежать повторного просмотра полей зрения препарата, его рекомендуется просматривать по следующей схеме: 3 параллельных прохода по длине препарата или 9 параллельных проходов по ширине препарата.

Стекло с мазком помещают на предметный столик непосредственно под объектив и закрепляют его с помощью клемм (или зажимного устройства) препаратоводителя. Поворотом револьверного устройства объектив смещают таким образом, чтобы стал свободным доступ к препарату. Иммерсионное масло капают на мазок, не касаясь поверхности предметного стекла пипеткой, и дают маслу свободно стечь – пипетка или капельница масла ни в коем случае не должна соприкоснуться с мазком (рис. 2).

Микроскопировать начинают с левого верхнего выбранного в мазке поля зрения, постепенно передвигаясь либо вдоль продольной оси препарата до конца мазка, либо смещаясь вниз



Рисунок 2. Нанесение иммерсионного масла на мазок.

Figure 2. The immersion oil is placed on the smear.

и затем вновь поднимаясь вверх и т.д., проходя все поля зрения до границы мазка. После микроскопирования каждого мазка оптику объектива протирают чистой салфеткой для линз во избежание перекрестного переноса КУМ.

Подготовка микроскопа к работе и порядок проведения микроскопического исследования

- Проверить микроскоп на наличие поврежденных или сломанных частей.
- Убедиться в том, что все компоненты оптической системы (линзы, зеркала, светопроводящие поверхности) чисты.
- Проверить положение конденсора – он должен находиться в верхнем положении с открытой апертурной диафрагмой.
- Скорректировать свет с помощью зеркала (при его наличии), конденсора и диафрагм таким образом, чтобы четкий пучок света был направлен в объектив (настройка освещения по Келеру).
- Проверить работу фокусировочного механизма грубой настройки (макрвинт), опуская предметный столик и отдаляя таким образом его от объектива.
- Повернуть револьверное устройство с объективами таким образом, чтобы объектив с малым увеличением (5× или 10×) оказался в рабочем положении (над конденсором).
- Поместить стекло с мазком на предметный столик непосредственно под объектив, закрепить его с помощью клемм (или зажимного устройства) препаратоводителя.
- С помощью рукояток препаратоводителя или предметного координатного столика сле-

дует выбрать участок на препарате для начала просмотра – для светового микроскопа это может быть наиболее интенсивно окрашенный участок препарата.

- Установить глазную базу бинокулярной насадки с помощью разведения окулярных трубок и движением головы добиться совмещения выходящего зрачка микроскопа с входным зрачком глаза таким образом, чтобы оба глаза наблюдателя видели одно равномерно освещенное поле на предмете.
- Глядя сбоку от предметного столика, необходимо контролировать расстояние, остающееся между препаратом и фронтальной линзой объектива. Вращая рукоятку грубой фокусировки, следует приблизить предметный столик с препаратом к объективу как можно ближе, но не касаясь его поверхности.

Не допускать соприкосновения предметного стекла с фронтальной линзой объектива!

- Наблюдая через окуляры и медленно вращая рукоятку грубой фокусировки, осуществить движение предметного столика с препаратом вниз от линзы объектива до получения резкого изображения мазка.
- С помощью рукоятки точной фокусировки (микровинта) добиться наиболее четкого изображения мазка.
- Настроить освещение таким образом, чтобы было достаточно ярко, но в то же время не слепило глаза и не вызывало дискомфорта. Настройку можно осуществлять как с помощью изменения интенсивности накала лампы,

так и регулировкой апертурной диафрагмы конденсора, или использованием нейтральных светофильтров. Как правило, изменение светового конуса (осветительной апертуры) с помощью изменения диаметра апертурной диафрагмы – вполне достаточное средство для изменения интенсивности освещенности.

- Установить на окулярной трубке с диоптрийной наводкой (или на окуляре с диоптрийной наводкой) «0» относительно неподвижной риски. Глядя правым глазом в правый окуляр, с помощью механизма точной фокусировки добиться резкого изображения мазка для правого глаза. Наблюдая левым глазом в левый окуляр, с помощью подвижного диоптрийного механизма на окулярной трубке (или подвижного оптического элемента окуляра) получить резкое изображение мазка для левого глаза.

- При использовании иммерсионной системы следует поворотом револьверного устройства сместить сухой объектив так, чтобы стал свободным доступ к препарату. Необходимо капнуть иммерсионное масло на мазок, не касаясь поверхности предметного стекла пипеткой или палочкой, дать маслу свободно стечь.

Пипетка или капельница масла ни в коем случае не должна соприкоснуться с мазком!

- Контролируя со стороны, следует проверить револьверное устройство с объективами и установить в рабочее положение (непосредственно над мазком) иммерсионный объектив (90×–100×). Убедиться, что фронтальная линза объектива не касается предметного стекла.

- Глядя сбоку, медленно вращать рукоятку грубой фокусировки, приближая препарат к объективу до соприкосновения иммерсионного объектива с маслом, затем слегка погрузить объектив в масло (до появления эффекта «втягивания» капли).

Никогда не допускайте соприкосновения линзы объектива с предметным стеклом – это может повредить фронтальную линзу объектива или разбить препарат!

- Мазок должен почти идеально совпадать с фокусом объектива. Настройку на резкость следует производить с помощью винтов грубой и точной регулировки (лучшее наведение достигается при помощи микровинта). Глядя в окуляры, медленно опускайте предметный столик микроскопа с помощью макровинта до появления

образа, для подфокусировки следует воспользоваться рукояткой точной фокусировки и добиться резкого изображения мазка. При смене объектива целесообразно провести поднастройку света.

Техника просмотра мазка

- Ежедневно включайте в работу положительный и отрицательный контрольные препараты. Положительный контроль гарантирует окрашивающую способность растворов и корректность метода. Отрицательный контроль подтверждает отсутствие в растворах и красителях кислотоустойчивых артефактов.

- Техника просмотра мазка требует систематичности, например, просмотрите мазок по длине несколько раз или зигзагообразно. Тщательно просматривайте каждое поле и затем переходите к следующему.

- Просмотрите минимум 100 полей, прежде чем квалифицировать препарат как отрицательный. Для подтверждения отрицательного результата рекомендуется просматривать дополнительно от 100 до 200 полей зрения, чтобы в случае конечного отрицательного результата было просмотрено не менее 300 полей зрения.

- При наличии в мазке значительного количества КУМ достаточно исследовать 20–50 полей зрения (при этом количество исследуемых полей варьируется в зависимости от количества КУМ, обнаруживаемых в каждом из просматриваемых полей зрения (табл. 1)).

- После просмотра мазка уберите препарат с предметного столика, проверьте идентификационный номер и запишите результат. Устраните иммерсионное масло с мазка с помощью ксилола, спирта или спирто-эфирной смеси и поместите препарат в специальный ящик для хранения просмотренных препаратов.

- Перед просмотром следующего мазка необходимо протереть объектив микроскопа чистой салфеткой для линз.

- При просмотре мазков в поле зрения могут попадать случайные объекты. Если эти объекты двигаются только вместе с мазком, то, вероятно, они попали в материал мазка вместе с микротой, реагентами, красителями или иммерсионным маслом.

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

- Сохраняйте все препараты для внешнего контроля качества.

По окончании микроскопического исследования стекла очищают от масла следующим образом:

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

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

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

Морфологические особенности кислотоустойчивых МБ

Кислотоустойчивые МБ имеют вид тонких, прямых или слегка изогнутых палочек с незначительно закругленными концами, гомогенных или зернистых, длиной 1–10 (чаще 1–4) мкм и шириной 0,2–0,6 мкм.

Микроскопическое исследование методом Циля-Нильсена не позволяет определить вид выявленных МБ и дифференцировать МБ туберкулезного комплекса от НТМБ.

Как правило, при окраске по методу Циля-Нильсена *M. tuberculosis* видны в мазке в виде более или менее гранулированных бактерий, расположенных поодиночке, в парах или группами, которые хорошо различимы на голубом фоне. У отдельных бактерий на однородно окрашенном фоне в цитоплазме можно увидеть интенсивно окрашенные участки, называемые гранулами.

Некоторые НТМБ отличаются полиморфизмом и могут иметь форму удлинённых палочковидных форм, а также могут присутствовать в мазке в виде более однородно окрашенных кокковидных форм.

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

Отметим, что быстрорастущие МБ не всегда способны сохранять кислотоустойчивость после обработки кислотами.

Важно! Не пытайтесь определить вид микобактерий на основании микроскопического исследования!

Причины ошибок при микроскопии

Ошибки, связанные с исследуемым материалом:

- неудовлетворительное качество и/или объем диагностического материала;
- неудовлетворительная обработка многообразных контейнеров для сбора мокроты, что приводит к появлению ложноположительных результатов;
- невнимательность при маркировке контейнеров (маркировку следует проводить сбоку, а не на крышке контейнера).

Ошибки, связанные с приготовлением мазка:

- недостаточно или плохо освещенная рабочая поверхность;
- ошибка в нумерации мазков;
- использование предметных стекол с ранее положительным результатом (стекла с положительным результатом должны уничтожаться);
- контаминация материала из-за ошибок при использовании петель, пипеток;
- приготовление слишком большого количества мазков (одновременное окрашивание, при котором возможно перетекание растворов с одного мазка на другой и перекрестная контаминация мазков; за 1 раз рекомендуется готовить не более 12 мазков).

Ошибки, связанные с окрашиванием мазка:

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

Ошибки, связанные с просмотром мазка:

- ошибочная нумерация после окраски – на отдельных мазках нумерация в процессе окрашивания частично стирается и становится неясной, что приводит к ошибочной подмене мазков;

- присутствие МБ в иммерсионном масле, что является результатом существующей практики касания пипеткой или горлышком масленки поверхности положительного мазка;

- невыполнение такой рекомендации, как обязательное протирание линз объектива после просмотра каждого мазка, особенно – после положительного;

- ошибочная регистрация результата.

Негативные последствия ложноположительных и ложноотрицательных результатов микроскопического исследования

Последствия ложноположительных результатов:

- пациентов берут на учет в противотуберкулезный диспансер и назначают ненужное и потенциально вредное лечение токсичными антибактериальными препаратами;

- необоснованно расходуются финансовые средства в связи с проведением ненужного лечения;

- необоснованно продлевается интенсивная фаза лечения при контроле химиотерапии;

- потеря доверия к лаборатории.

Последствия ложноотрицательных результатов:

- больные ТБ не получают должного лечения, являются очагом инфекции, выявляются с распространенными процессами или смертно;

- интенсивная фаза химиотерапии не продлевается на требуемый период, что ухудшает результаты лечения;

- потеря доверия к лаборатории.

Регистрация результатов исследования

Микроскопическое исследование должно выявить в мазке кислотоустойчивые палочковидные формы МБ и определить их количество в поле зрения.

Все результаты микроскопии должны заноситься в лабораторный регистрационный журнал. В течение календарного года производится непрерывная нумерация выполняемых исследований.

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

Таблица. Градация результатов микроскопического исследования

Table. Gradation of microscopic examination results

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

Интерпретация результатов исследования

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

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

Положительный результат. Положительный результат вписывается красными чернилами в лабораторный журнал и в бланк ответа. Число КУМ, найденных в мазке, указывает на степень контагиозности больного. В связи с этим, результаты должны быть представлены в количественном выражении. Различают 4 уровня положительного ответа: единичные (указывается количество КУМ в 100 полях зрения), 1+, 2+, 3+.

Важно! Отрицательный результат микроскопического исследования не исключает диагноз туберкулеза, так как в мокроте пациента может содержаться меньше микобактерий, чем может выявить микроскопическое исследование.

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ ИЗ КУЛЬТУРЫ

Данный вид исследования проводится с целью оценить результаты посева диагностического материала на питательные среды и подтвердить наличие роста МБ.

При окраске по Цилю-Нильсену кислотоустойчивые МБ выглядят красными на синем фоне. Однако особенность микроскопии препаратов, приготовленных из культуры, состоит в том, что в мазке отсутствуют клеточные элементы, придающие препарату синий фон. Это обстоятельство может вызывать некоторые сложности при проведении микроскопического исследования.

Следует также иметь в виду, что клетки, выращенные на питательной среде, отличаются внешне от видимых в нативном препарате. Как правило, МБ из культуры чуть толще и короче, окраска их ярче. Клетки могут быть агрегированы или сплетаться в колонии. Микроколонии МБ в виде кос и жгутов можно увидеть в мазках культуры *M. tuberculosis*, выросшей на полужидкой или жидкой среде (рис. 3).

Часто в препарате, особенно из длительно растущих культур, видны скопления темноокрашенных зерен. В молодых культурах, особенно выделенных от больных, длительно леченных противотуберкулезными препаратами, МБ отличаются большим полиморфизмом, вплоть до появления коротких, почти кокковидных форм.

Если морфология колоний или МБ вызывает сомнения в их принадлежности к роду *Mycobacterium* или культуры выделены из материала, который может содержать кислотоустойчивые сапрофиты (моча, гной из ушей и др.), мазки дополнительно обесцвечивают 3% солянокислым спиртом в течение 40–45 минут. При этом следует учитывать, что молодые культуры МБТ могут сравнительно легко обесцвечиваться солянокислым спиртом, так как они обладают слабой кислотоустойчивостью. В таких случаях культуры следует выдержать в термостате еще 5–10 дней и вновь повторить микроскопическое исследование, чтобы убедиться в их тинкториальных свойствах.

Что касается культур НТМБ, то клетки некоторых из них выглядят при микроскопии грубее и толще, иногда они менее интенсивно окрашены, и редко образуют жгутообразные скопления. Многие нетуберкулезные и сапрофитные МБ имеют кислотоустойчивые зерна, сходные по морфологии с таковыми у вирулентных МБТ.



Рисунок 3. Вид под микроскопом культуры *M. tuberculosis*, выросшей на жидкой среде Миддлбрук 7Н9.
Figure 3. Viewing under the microscope *M. tuberculosis* cultures grown on Middlebrook 7H9 broth.

При просмотре мазка следует обратить внимание на морфологические особенности палочек и расположение их в препарате. НТМБ в мазке из культуры могут располагаться в виде «частокола», «паркета» или иметь форму коккобацилл. Отдельные примеры видов под микроскопом культур НТМБ, выросших на жидкой или плотной питательных средах, представлены на рис. 4–6.

Важно! Несмотря на то, что морфологическая характеристика обнаруженных палочек может ассоциироваться с определенным видом МБ, она не является основанием для видовой идентификации.

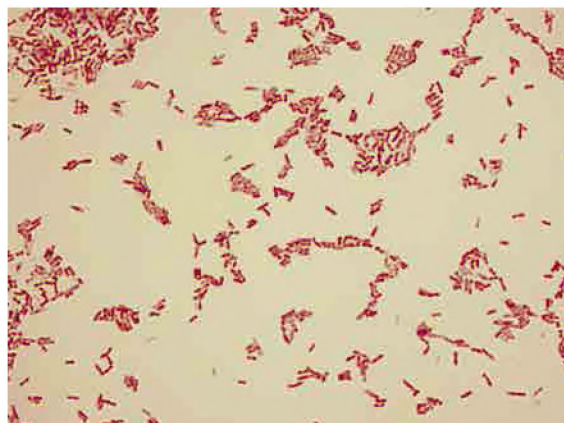


Рисунок 4. Вид под микроскопом культуры *M. kansasii*, выросшей на жидкой среде Миддлбрук 7Н9.
Figure 4. Viewing under the microscope *M. kansasii* cultures grown on Middlebrook 7H9 broth.

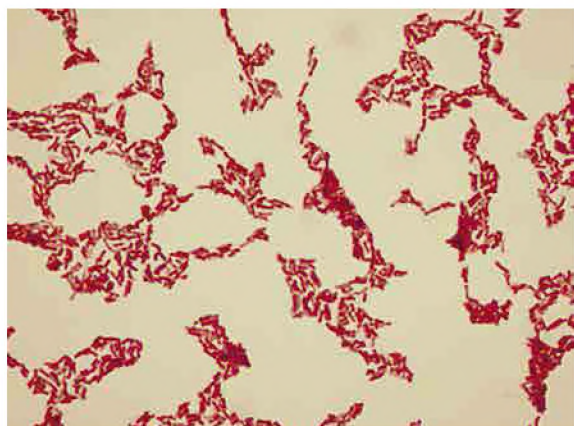


Рисунок 5. Вид под микроскопом культуры *M. gordoniae*, выросшей на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена.

Figure 5. Viewing under the microscope *M. gordoniae* cultures grown on Lowenstein-Jensen solid medium.

Отметим, что группа родственных микроорганизмов (нокардии, родококки и др.) отличается частичной или слабой кислотоустойчивостью. В мазке можно одновременно встретить красные и синие палочки или фиолетово-синие коккобациллы. Морфологически в мазке из культуры они представлены в виде мицелия, фрагментирующегося на палочки, или крупных полиморфных палочек.

В заключение подчеркнем, что в работе лаборатории встречаются культуры, которые по морфологическим признакам не укладываются в характеристику *M. tuberculosis*, но демонстрируют кислотоустойчивость при окраске мазка. И, наоборот, при внешнем сходстве колоний с колониями *M. tuberculosis*, микроскопическая картина (мелкие палочки, коккобациллы) вызы-

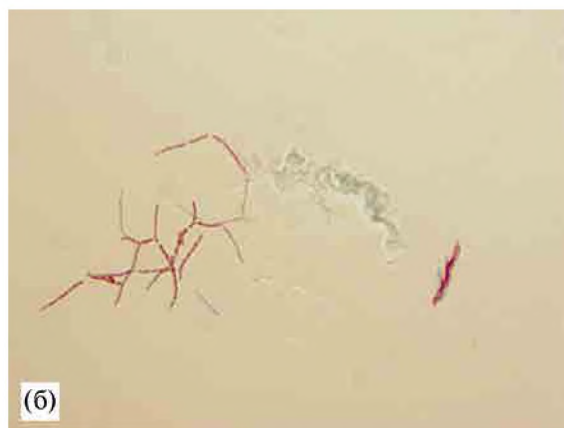


Рисунок 6 (а, б). Виды под микроскопом культуры *M. fortuitum*, выросшей на жидкой среде Миддлбрук 7Н9.

Figure 6 (а, б). Viewing under the microscope *M. fortuitum* cultures grown on Middlebrook 7H9 broth.

вает сомнения в принадлежности культуры к этому виду. В любом случае, нельзя выдавать ответ о выделении *M. tuberculosis* до проведения дифференциации с НТМБ.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

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

Севастьянова Элина Викторовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела микробиологии

Тел.: +7 (499) 785-90-91

E-mail: elinasev@yandex.ru

Ларионова Елена Евгеньевна – кандидат биологических наук, 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 Sciences, Leading Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: elinasev@yandex.ru

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

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