

Методики лабораторных исследований

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКОБАКТЕРИЙ МЕТОДОМ МИКРОСКОПИИ ПРЕПАРАТОВ, ОКРАШЕННЫХ ПО ЦИЛЮ-НИЛЬСЕНУ

Часть 1. Приготовление и окрашивание препаратов для микроскопии

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

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

Поступила: 14.12.2018

Изложен метод выявления микобактерий (МБ) с помощью микроскопического исследования препаратов, окрашенных по методу Циля-Нильсена. Описаны варианты приготовления препаратов для микроскопии из необработанной мокроты, осадка диагностического материала, а также из культуры МБ. Представлена методика окрашивания препаратов по Цилю-Нильсену. Проведен анализ возможных ошибок при приготовлении и окраске мазков.

Ключевые слова: микобактерии, метод Циля-Нильсена.

DOI: 10.7868/S2587667819010114

Laboratory Techniques

MICROSCOPIC DETECTION OF MYCOBACTERIA BY ZIEHL-NEELEN STAINING TECHNIQUE

Part 1. Smear preparation and staining procedure

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

Central TB Research Institute, Moscow, Russia

Submitted as of 14.12.2018

We have described the microscopic detection of mycobacteria using Ziehl-Neelsen staining of smears. We described variants of smear preparation from untreated sputum, specimen sediments, and mycobacterial culture. We also represented the method of Ziehl-Neelsen smear staining, and analyzed possible errors, which occurred during preparation and staining of smears.

Keywords: mycobacteria, Ziehl-Neelsen microscopy.

ВВЕДЕНИЕ

Микроскопия – один из старейших методов, применяемых в микробиологических исследованиях, однако, несмотря на развитие и использование современных диагностических методик, он до сих пор не утратил своей актуальности и включен в схемы обследования на туберкулез (ТБ) [3].

Окраска микроскопических препаратов по методу Циля-Нильсена, также известная как окраска на наличие кислотоустойчивых бактерий, была впервые описана двумя немецкими врачами: бактериологом Францем Цилем и патологоанатомом Фридрихом Нильсеном [6].

Эта окраска используется для того, чтобы быстро выявить кислотоустойчивые микроорганизмы (КУМ), главным образом – МБ. В первую

очередь – это *M. tuberculosis*, являющиеся возбудителем ТБ, а также другие важные виды МБ, вызывающие заболевания человека, к которым в настоящее время относятся около 40 видов микобактерий, таких как *M. bovis*, *M. africanum*, *M. avium complex*, *M. abscessus*, *M. leprae*, *M. kansasii*, *M. marinum*, и другие.

Характерной особенностью МБ является наличие чрезвычайно устойчивой к внешним воздействиям гидрофобной клеточной стенки, что обуславливает такие свойства МБ, как кислото-, щелоче- и спиртоустойчивость. Выявление МБ методом микроскопии с окраской по Цилю-Нильсену основано на способности МБ к кислотоустойчивому окрашиванию (способность удерживать краситель даже после длительного обесцвечивания серной кислотой или солянокислым спиртом).

Наличие в клеточных стенках МБ большого количества липидных веществ (миколовых кислот) препятствует проведению окрашивания их общепринятым для бактерий методом Грама. МБ не окрашиваются обычными анилиновыми красителями. Кислотоустойчивость выявляется только с помощью специальных методов окраски, одним из которых является метод Циля-Нильсена. Принцип метода состоит в том, что при одновременном воздействии нагревания и сильного протравливающего вещества – фенола (карболовой кислоты), на котором готовится основное красящее вещество фуксин, облегчается проникновение анилинового красителя в микробную клетку и, особенно, в структуры ее клеточной стенки. Связывание красителя с пептидогликолипидами клеточной стенки увеличивает ее гидрофобность и способствует удержанию красителя в цитоплазме. Последующее обесцвечивание мазка приводит к обесцвечиванию всех некислотоустойчивых структур. Только кислото- и спиртоустойчивые микроорганизмы стойко удерживают краситель и остаются после обесцвечивания окрашенными в малиново-красный цвет. Обесцвеченные элементы мазка докрашивают метиленовым синим. Помимо МБ, метод окраски по Цилю-Нильсену выявляет также и другие кислотоустойчивые бактерии, такие, например, как *Nocardia* и *Rhodococcus*.

Метод прямой микроскопии препаратов, окрашенных по Цилю-Нильсену, используется в основном в клинико-диагностических лабораториях для первичного выявления КУМ у лиц с подозрением на ТБ и другие микобактериальные инфекции. Кроме того, метод Циля-Нильсена применяется в бактериологических лабораториях медицинских организаций, оказывающих специализированную медицинскую помощь по

профилю «фтизиатрия», для первичной идентификации культур микроорганизмов, выросших на плотных и жидких питательных средах, а, при необходимости, может быть использован и для выявления наличия КУМ в диагностическом материале. Метод Циля-Нильсена также применяется в патологоанатомической практике и в научно-исследовательских работах.

В настоящее время метод Циля-Нильсена унифицирован и используется в соответствии с международными и отечественными рекомендациями [1, 2, 4, 5].

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МИКРОСКОПИИ

Основным видом диагностического материала для проведения прямого микроскопического исследования методом Циля-Нильсена является мокрота. Качественным материалом можно считать свежевыделенную мокроту, имеющую слизистый или слизисто-гнойный характер, а также содержащую плотные белесоватые включения. Достаточный объем образца мокроты для исследования составляет 3–5 мл, хотя и меньшее количество может оказаться достаточным при удовлетворительном качестве.

Наибольшая вероятность найти КУМ в неконцентрированном диагностическом материале представляется при исследовании плотных и твердых комочков в мокроте, и результат прямого микроскопического исследования в большой степени зависит от выбора именно этих комочков. В связи с этим, необходимо, чтобы материал поступал в лабораторию в одноразовых пластиковых прозрачных контейнерах объемом 20–50 мл. Использование таких контейнеров позволяет легко оценить качество и объем собранного материала, а при приготовлении мазков для микроскопии – проводить выбор гнойных комочков непосредственно из контейнера, избегая чрезвычайно эпидемически опасного этапа выливания мокроты в чашку Петри.

Приготовление препаратов для микроскопического исследования является одной из наиболее эпидемически опасных процедур, поскольку в процессе подготовки материала для исследования создается высокий риск образования аэрозолей с диаметром частиц от 1 до 5 мкм, которые способны проникать в легочные альвеолы и оседать в них, формируя очаг инфекции. Поэтому приготовление препаратов рекомендуется проводить в вытяжном шкафу или (предпочтительно) в боксе биологической безопасности

с соблюдением всех общепринятых стандартных норм биобезопасности.

Препараты следует готовить в количестве, с которым удобно и безопасно работать. При их маркировке следует избегать касания пальцами поверхности предметных стекол. Номер наносят с помощью несмываемого маркера или воскового карандаша по стеклу с таким расчетом, чтобы в процессе окраски этот номер сохранился.

Подготовка предметных стекол

Процедура приготовления препаратов для микроскопии начинается с подготовки предметных стекол. Необходимо использовать только новые, отмытые и обезжиренные стекла без царапин и сколов. Не рекомендуется повторно использовать предметные стекла, поскольку они могут быть недостаточно хорошо отмыты от предыдущего материала, что в дальнейшем может привести к получению ложноположительных результатов.

Новые предметные стекла кипятят в 1% растворе питьевой соды (10 г двууглекислого натрия на 1 л воды), промывают в 1% растворе соляной кислоты (к 1 л воды добавляют 10 мл концентрированной соляной кислоты), а затем промывают проточной водой и протирают насухо. Для обезжиривания вымытые и высушенные стекла помещают в герметически закрытые емкости со смесью Никифорова (96% этиловый спирт + эфир в соотношении 1:1) или с 96% этиловым спиртом на срок не менее 24 часов. Непосредственно перед приготовлением препарата стекла повторно протирают насухо. Кроме того, возможно обезжиривание новых стекол путем прожигания их в горячей части пламени горелки.

Методика приготовления препарата для микроскопии из нативной необработанной мокроты

- Промаркируйте чистое, сухое, обезжиренное предметное стекло с одного края тем же номером, что и на контейнере с мокротой (лабораторный номер, который присвоен данному образцу).

- Выберите в мокроте комочки рядом с кровяными прожилками, непрозрачные, сероватого или желтоватого оттенка (рис. 1).

- Перенесите требуемое количество материала на предметное стекло, используя деревянные палочки-аппликаторы (перед использованием палочку-аппликатор разламывают пополам) или бактериологическую петлю (количество материала в 1 петле достаточно для приготовления 1 мазка).



Рисунок 1. Выбор гнойных комочков из контейнера с мокротой.

Figure 1. Selection of purulent lumps from a sputum container.

Важно! Избегайте многократного взятия материала и отрывов петли или аппликатора от мазка – при этих манипуляциях образуется аэрозоль!

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

Важно! Не делать более одного мазка на предметное стекло!

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

Важно! Не использовать подогрет для подсушивания мазков!

Методика приготовления препарата для микроскопии из осадка необработанного жидкого диагностического материала

При исследовании любого жидкого диагностического материала (бронхоальвеолярные смывы, промывные воды бронхов или желудка, моча, пунктаты из закрытых полостей, эксудаты) препараты для микроскопии можно приготовить из осадка необработанного нативного материала, что позволяет увеличить вероятность получения положительного результата исследования, поскольку осадок представляет собой обогащенную фракцию диагностического материала.

Препараты готовят следующим образом:

- диагностический материал центрифугируют при 3000 g в течение 20 минут;
- аккуратно удаляют надосадочную жидкость;
- полученный в пробирке осадок перемешивают;
- с помощью пипетки наносят на стекло 1–2 капли осадка, распределяя его тонким слоем в центре стекла на площади не менее 1 × 2 см;
- препарат высушивают на воздухе.

Необходимо иметь в виду, что мазки из осадка жидких материалов легко смываются в процессе окраски. Поэтому их желательно приготавливать на стеклах, предварительно обработанных яичным белком.

Для этого белок куриного яйца в течение 30–40 минут взбивают с чистыми стерильными стеклянными бусами в стерильной посуде и оставляют на 1–1,5 часа при комнатной температуре. Затем жидкую часть взбитой смеси отбирают пипеткой, переносят ее в другую посуду и, смачивая в ней ватный тампон, аккуратно наносят ее на чистые обезжиренные предметные стекла, равномерно распределяя по 2/3 их поверхности. 1/3 предметного стекла оставляют необработанной белком для последующего нанесения на нее номера пробы.

Обработанные белком стекла раскладывают на чистой фильтровальной бумаге и высушивают при комнатной температуре. Стекла готовят накануне их использования, срок их хранения не должен превышать двух суток.

Другим способом закрепления осадка жидкого материала является использование сыворотки крови. На чистом стекле смешивают каплю сыворотки с 1–2 каплями осадка материала, распределяют смесь по стеклу и высушивают.

Методика приготовления препарата для микроскопии из осадка диагностического материала, подготовленного для культурального исследования

Важно! Все препараты из осадка готовят после выполнения процедуры посева.

Для приготовления мазка чаще всего используется та же пипетка, которой производился посев. Оставшийся после посева осадок встряхивают, забирают в пипетку и наносят на стекло 1–2 капли осадка, который распределяют тонким слоем в центре стекла на площади 1 × 2 см, после чего приготовленный препарат высушивают на воздухе.

Методика приготовления препарата для микроскопии из культуры, выросшей на плотной питательной среде

При приготовлении препаратов следует иметь в виду, что колонии микобактерий туберкулеза (МБТ) в силу своих физико-химических особенностей не эмульгируются в изотоническом растворе, а образуют зернистую крошковидную суспензию, что обусловлено наличием в составе их клеточной стенки большого количества гидрофобных жирно-восковых субстанций.

Препараты готовят следующим образом:

- поместить около 50 мкл (2 капли) дистиллированной воды на предметное стекло пипеткой Пастера;
- используя стерильную петлю, переместить 2–3 колонии в каплю воды и осторожно перемешать, чтобы получить однородную суспензию;
- высушить препарат на воздухе.

Приготовление препарата для микроскопии из культуры, выросшей на жидкой питательной среде

- Хорошо перемешать содержимое пробирки MGIT на Вортексе;
- с помощью пипетки Пастера отобрать из пробирки приблизительно 50 мкл (2 капли) бульона на предметное стекло, но не распределять его по стеклу, оставить каплей;
- высушить препарат на воздухе.

Фиксация препаратов

Важно! Не допускается фиксация сырых препаратов над пламенем горелки!

Фиксируйте препараты одним из ниже перечисленных методов.

1 метод. Высушенные стекла пинцетом или специальными щипцами берут за конец, на котором нанесена маркировка, и 3 раза проводят через среднюю часть пламени спиртовки или верхнюю часть пламени газовой горелки до исчезновения признаков запотевания стекла (рис. 2). Общая продолжительность пребывания мазка в пламени не должна превышать 3–5 секунд. Затем стекла помещают на специальный поднос или чистую бумагу.

2 метод. Поместите препараты в сушижаровой шкаф и проведите фиксацию при 85 °С в течение 45 минут с момента достижения указанной температуры или при 80 °С в течение 1 часа. Либо оставьте препараты на электрическом фиксаторе (65–75 °С) не менее чем на 2 часа (рис. 3).



Рисунок 2. Фиксация мазка над пламенем газовой горелки.

Figure 2. Smear fixation above the flame of the gas burner.

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

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

Следует помнить, что чистые кристаллы фенола бесцветны; при появлении коричневого окрашивания или коричневых или красных вкраплений фенол не следует использовать во избежание получения неудовлетворительно окрашенных мазков. Для предотвращения окисления фенола используют фасовку не более 0,5 кг. Вскрытую фасовку рекомендуется хранить в холодильнике в герметично закрытом флаконе.



Рисунок 3. Способ фиксации мазков на электрическом фиксаторе.

Figure 3. Smear fixation on the electric heater.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ КРАСИТЕЛЕЙ

Степень чистоты реактивов

Применяемые реактивы зачастую не являются химически чистыми, в связи с чем навеску для приготовления раствора необходимо корректировать. Как правило, производители указывают на упаковке процент чистого вещества. Правильная навеска определяется вычислением поправочного коэффициента и умножением требуемого количества красителя на поправочный коэффициент.

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

- разделите 100 на величину процентного содержания фуксина в реактиве для получения поправочного коэффициента: $100 / 75 = 1,33$ – поправочный коэффициент;
- умножьте 1,33 на 3 г = 3,99 г.

Общие принципы приготовления растворов

1. Применяйте для взвешивания весы с чувствительностью не менее 0,01 г.
2. При взвешивании легких субстанций, избегайте их распыления и вдыхания пыли – применяйте респираторы.
3. При приготовлении растворов первоначально растворите исходное вещество в небольшом объеме. В случае реакций растворения, сопровождающихся нагреванием раствора (экзотермических), дождитесь его охлаждения. После растворения вещества доведите объем раствора до требуемого.
4. При доведении объема растворов используйте только индивидуально стандартизованные мерные колбы или цилиндры.

Приготовление растворов для метода окраски по Цилю-Нильсену

Раствор 1. Насыщенный спиртовой раствор фуксина (3%):

- разотрите в ступке 0,3 г основного фуксина с 2–3 каплями глицерина, добавьте по каплям 10 мл 96% этилового спирта. Добейтесь полного растворения фуксина.

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

- расплавьте 5 г кристаллического фенола на водяной бане или в термостате (температура плавления фенола 41 °С);

Осторожно! При попадании на кожу фенол вызывает ожоги.

- растворите расплавленный фенол в 100 мл воды.

Раствор 3. Рабочий раствор карболового фуксина:

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

Раствор 4. Обесцвечивающий раствор 25% серной кислоты:

- к 75 мл дистиллированной воды осторожно долейте 25 мл концентрированной серной кислоты, постепенно насаивая ее по стенкам сосуда. Смешайте. Содержимое нагреется.

Или

соляной кислоты (3% солянокислый спирт):

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

Всегда медленно добавляйте кислоту в спирт, а не наоборот!

Смесь может нагреться.

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

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

Рабочие растворы карболового фуксина и метиленового синего должны быть профильтрованы и помещены в герметически закрытые емкости из темного стекла. Обязательной является маркировка с указанием названия раствора, его концентрации, даты приготовления и сроком годности.

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

ОКРАШИВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДОМ ЦИЛЯ-НИЛЬСЕНА

Окраску мазков методом Циля-Нильсена рекомендуется проводить в вытяжном шкафу, оборудованном раковиной для окраски мазков. Организация рабочего места для окраски мазков представлена на рис. 4.1.

Процедура окраски

1. Маркированные предметные стекла с нанесенными на них мазками диагностического материала помещают на специальный штатив так, чтобы они не касались друг друга, а их маркировка (номера) была направлена в одну сторону. На стандартный штатив помещается не более 12 стекол. Кроме того, временной режим и интервалы окрашивания позволяют окрашивать не более 12 мазков одновременно.

2. На фиксированный препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги, размером немного меньше предметного стекла, но так, чтобы она закрывала мазок полностью. Фильтровальную бумагу используют для предотвращения растекания красителя по стеклу и возможного осаждения кристаллов краски на мазок.

3. На бумагу наливают (рис. 4.2) раствор карболового фуксина (препарат должен быть обильно смочен) и нагревают препарат над пламенем горелки до появления легкого облачка паров, не допуская закипания краски и высыхания бумаги (рис. 4.3). Объем красящего раствора должен быть достаточным для того, чтобы его повторно не наносить на уже разогретый мазок. В случае высыхания мазка и повторного нанесения красителя, нагрейте мазок до появления паров повторно.

4. Мазок оставляют на **5 минут** с красителем, чтобы он проник в клеточную стенку МБ и окрасил ее.

5. Пинцетом осторожно снимают фильтровальную бумагу и помещают ее в емкость с дезинфицирующим раствором (рис. 4.4).



Рисунок 4.1. Общий вид рабочего места для окраски мазков.

Figure 4.1. The general view of the workplace for smear staining.



Рисунок 4.2. Нанесение на препараты раствора карболового фуксина.

Figure 4.2. Carbol-fuchsin solution staining of smears.



Рисунок 4.3. Поочередное нагревание препаратов над пламенем спиртовки.

Figure 4.3. Alternate heating of the smears above the flame of the spirit lamp.



Рисунок 4.4. Удаление фильтровальной бумаги пинцетом в емкость с дезинфицирующим раствором.

Figure 4.4. Removal of the filter paper with tweezers into a container with disinfecting solution.



Рисунок 4.5. Смывание остатков краски с препаратов слабой струей воды.

Figure 4.5. Washing off the stain from the smears with a weak stream of water.



Рисунок 4.6. Удаление остатков воды, выполняемое после каждой процедуры промывки (стекла с мазками поочередно ставят пинцетом на ребро).

Figure 4.6. Removal of water after each washing procedure (smear glasses are alternately put on edge with tweezers).



Рисунок 4.7. Нанесение на препараты обесцвечивающего раствора.

Figure 4.7. Dye solution is poured on the smears.



Рисунок 4.8. Нанесение на препараты раствора метиленового синего.

Figure 4.8. Methylene blue solution is poured on the smears.



Рисунок 4.9. Высушивание препаратов при комнатной температуре в вертикальном положении.

Figure 4.9. Drying the smears at room temperature in a vertical position.

Рисунок 4. Окрашивание препаратов методом Циля-Нильсена.

Figure 4. Ziehl-Neelsen smear staining.

6. Осторожно (!) смывают остатки краски слабой струей проточной воды или водой из резервуара (рис. 4.5). Вода должна быть комнатной температуры или холодной.

7. После каждой процедуры промывки, во избежание разбавления реактивов, каждое стекло аккуратно ставят пинцетом на ребро, чтобы стекли остатки воды (рис. 4.6).

8. Мазок обесцвечивают 25% раствором серной кислоты или 3% солянокислым спиртом (рис. 4.7), добиваясь визуального эффекта полного обесцвечивания. Продолжительность процедуры обесцвечивания – **3 минуты**.

9. Мазок промывают проточной водой, как описано ранее.

10. Мазок докрашивают 0,3% раствором метиленового синего (рис. 4.8) в течение **60 секунд**.

11. Мазок промывают проточной водой, как описано ранее.

12. Мазок высушивают при комнатной температуре в вертикальном положении (рис. 4.9). Не следует промокать препарат!

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

При проведении процедуры обесцвечивания мазков рекомендуется визуально оценивать степень обесцвечивания мазка, добиваясь исчезновения красного цвета. При неполном обесцвечивании мазка процедуру следует повторить. Препарат считается недостаточно обесцвеченным в том случае, если в окрашенном мазке мокроты сохраняется пигмент карболового фуксина.

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

Возможные ошибки при приготовлении и окраске мазка

- Недопустимо уменьшать время экспозиции с обесцвечивающим раствором. Если микроорганизмы действительно кислотоустойчивые, то под действием обесцвечивающего раствора они не потеряют этого свойства.

- Приготовление слишком толстых мазков может воспрепятствовать качественному контакту с обесцвечивающим реактивом, а фоновый краситель может маскировать присутствие КУМ. Кроме того, толстые мазки могут отслаиваться, что приводит к потере материала и возможному переносу его на другие мазки.

- Густота мазка считается приемлемой в том случае, если при микроскопическом исследовании препарата можно нанести резкость на полную глубину в каждом поле зрения.

- Нарушение технологии приготовления и хранения рабочих растворов красителей, а также неполное соблюдение методики окрашивания мазка может привести к наличию в окрашенном препарате артефактов, грязи, частиц или кристаллов, которые могут появиться в результате перегрева в процессе окраски.

- Слишком интенсивное фоновое окрашивание может маскировать присутствие КУМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голышевская В.И., Севастьянова Э.В., Шульгина М.В., Евгущенко Г.В., Егорова О.В. Выявление туберкулеза методом микроскопии. Учебное пособие для проведения базового курса обучения «Выявление туберкулеза методом микроскопии». М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. – 100 с.
2. Приказ МЗ РФ от 21 марта 2003 года № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». Приложение № 10 «Инструкция по унифицированным методам микроскопических исследований для выявления микобактерий в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», Приложение № 11 «Инструкция по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза».
3. Приказ МЗ РФ от 29.12.2014 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».
4. Ерохин В.В., Голышевская В.И., Попов С.А., Пузанов В.А., Евгущенко Г.В., Севастьянова Э.В., Мартынова Л.П., Иртуганова О.А. Унифицированный метод микроскопического выявления микобактерий. Руководство для клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений. М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. – 131 с.
5. Lumb R., Van Deun A., Bastian I., Fitz-Gerald M. Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy. *GLI*, 2013, 84 p.
6. Ziehl F. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. *Deutsche Med Wochenschr.*, 1882; 8:451.

REFERENCES

1. *Golyshevskaya V.I., Sevastyanova E.V., Shulgina M.V., Evgushchenko G.V., Egorova O.V.* TB detection by smear microscopy. A manual for basic training course: TB detection by smear microscopy). Moscow – Tver, Triada, 2008, 100 p. (In Russ.)
2. On improvement of TB control measures in the Russian Federation. Edict no. 109 by RF MoH as of 21.03.2003. Annex no. 10. A guideline to the unified methods of microscopic studies for mycobacteria detection at clinical diagnostic laboratories of therapeutic-and-prophylactic institutions. Annex no. 11. A guideline to the unified methods of microbiology studies in TB detection, diagnosis and treatment. (In Russ.)
3. On endorsement of methodical recommendations on improvement of pulmonary TB diagnosis and treatment. Edict no. 951 by RF MoH as of 29.12.2014. (In Russ.)
4. *Erokhin V.V., Golyshevskaya V.I., Popov S.A., Puzanov V.A., Evgushchenko G.V., Sevastyanova E.V., Martynova L.P., Irtuganova O.A.* The unified method of microscopic detection of mycobacteria. A guideline for clinical diagnostic laboratories of therapeutic-and-prophylactic institutions. Moscow – Tver, Triada, 2008, 131 p. (In Russ.)
5. *Lumb R., Van Deun A., Bastian I., Fitz-Gerald M.* Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy. *GLI*, 2013, 84 p.
6. *Ziehl F.* Zur Färbung des Tuberkelbacillus. *Deutsche Med Wochenschr*, 1882, no. 8, p. 451.

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

Андреевская 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