

Российские рекомендации по клинической микробиологии

Методы окраски

Документ 2/25

Год утверждения: 2025

Разработчики рекомендаций:

Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы
«Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «ФЛМ»)

Межрегиональная ассоциация общественных объединений
«Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и
антимикробной химиотерапии» (МАКМАХ)

Оглавление

Список сокращений.....	4
1. Введение.....	5
2.1 Приготовление мазков из жидких образцов (бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)), спинномозговая жидкость (СМЖ)/ликвор	5
2.2 Приготовление мазков из мочи	6
2.3 Приготовление мазков из образцов биоматериалов, полученных на тампонах.....	6
2.4 Приготовление мазка из вязкого материала (мокрота, гнойное отделяемое ран).....	6
2.5 Приготовление мазка из высохшего биоматериала или малого количества образца ...	6
2.6 Приготовление мазков из крови	7
2.7 Приготовление «толстой капли» крови	7
2.8 Приготовление мазков из органов и тканей.....	7
2.9 Приготовление мазков из микробных культур с жидкой питательной среды	8
2.10 Приготовление мазка из культур с плотных питательных сред	8
3.1 Физический способ фиксации	8
3.2 Химический способ фиксации.....	9
4. Способы окраски препаратов.....	9
4.1 Ориентировочные простые методы окраски.....	9
4.1.1 Техника окраски мазков.....	9
4.2 Сложные дифференциальные методы окраски.....	10
4.3 Техническая информация.....	11
4.4 Трудности интерпретации результатов окрашивания	11
4.5 Контроль качества	12
5. Методы окраски.....	12
5.1 Окраска по методу Грама.....	12
5.1.1 Образцы для окраски по методу Грама.....	13
5.1.2 Безопасность	14
5.1.3 Проведение окраски по методу Грама	14
5.1.4 Проведение окраски по методу Грама в модификации по Синеву	15
5.1.5 Проведение окраски по методу Грама в модификации Г. П. Калины	15
5.1.6 Интерпретация результатов микроскопии мазков, окрашенных по методу Грама	16
5.1.7 Контроль качества окраски по методу Грама.....	16
5.1.8 Техническая информация	17
5.1.9 Распространенные ошибки при окраске по методу Грама.....	18
5.1.10 Оценка результатов окраски по методу Грама.....	19

5.1.11 КОН-тест для уточнения сомнительных результатов окраски по методу Грама	21
5.1.12 Проведение КОН-теста	22
5.2 Окраска кислотоустойчивых микобактерий по методу Циля-Нильсена	22
5.2.1 Безопасность	22
5.2.2 Проведение окраски по методу Циля-Нильсена	23
5.2.3 Интерпретация результатов окраски по методу Циля–Нильсена	23
5.3 Окраска по методу Романовского-Гимзе	24
5.3.1 Проведение окраски по методу Романовского-Гимзе	24
5.4 Окраска калькофлуором белым	24
5.5 Другие способы окраски	28

Список сокращений

БАЛ	Бронхоальвеолярный лаваж
ЖКТ	Желудочно-кишечный тракт
КОН	Гидроксид калия
КУМ	Кислотоустойчивые микобактерии
КФБ	Калькофлуор белый
HCl	Хлористоводородная кислота
СМЖ	Спинномозговая жидкость
<i>P. carinii</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

1. Введение

В данном документе описаны методы окраски препаратов, приготовленных из различных биоматериалов, а также из культур микроорганизмов, обычно используемых в клинической микробиологии для выявления патогенов и дифференциации клеток крови (например, краситель метиленовый синий используется для дифференцировки лейкоцитов).

Исследование окрашенных препаратов позволяет не только изучить морфологию бактерий, но и судить о некоторых деталях их химического строения, что достигается применением специальных красок.

Окрашивание включает:

- приготовление мазков для окрашивания;
- фиксацию;
- окрашивание красителями;
- микроскопию препарата.

2. Приготовление мазков для окраски

Для микроскопии возможно использовать различные образцы биоматериалов, а также культуры микроорганизмов, выращенные как в жидких, так и на плотных питательных средах.

2.1 Приготовление мазков из жидких образцов (бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), спинномозговая жидкость (СМЖ)/ликвор

- Поместить 5 или 6 капель жидкого образца в центрифугу цитоспинового типа.

Следовать процедуре работы на центрифуге по инструкции производителя;

***Примечание:** Использование цитоспиновой центрифуги для концентрирования жидких образцов повышает чувствительность окраски и сокращает время стандартного центрифугирования для более быстрого получения результатов.*

- Если образец вязкий или мутный или количество его недостаточно для концентрации, рекомендуется использовать пипетку Пастера для переноса 1-2 капель образца непосредственно на предметное стекло, предварительно отметив место с помощью маркера/карандаша. Дать капле (ям) сформировать одну большую каплю. Жидкость не размазывать. Для увеличения концентрации жидкости для исследования допускается добавить вторую каплю жидкости на ту же область предметного стекла.

2.2 Приготовление мазков из мочи

Пипеткой Пастера капнуть 1 каплю хорошо перемешанной нецентрифугированной мочи на предметное стекло, отметив предварительно карандашом место для мочи. Затем высушить мазок на воздухе.

2.3 Приготовление мазков из образцов биоматериалов, полученных на тампонах

- Оптимальным для приготовления мазка является наличие отдельного тампона. Некоторые системы для взятия образцов содержат два тампона в упаковке (для бактериоскопии и посева);
- Мазки с тампонов готовят посредством прокатывания тампона по предметному стеклу. Этот метод аппликации помогает сохранить морфологию и расположение клеток на участке локуса, с которого получен материал;
- Если получен только один тампон, рекомендуется поместить его в небольшое количество физиологического раствора или питательного бульона. Закрыть пробирку и встряхнуть её. Отжать тампон о стенки пробирки и использовать его для приготовления мазка. Оставшуюся суспензию использовать для посева на питательные среды.

2.4 Приготовление мазка из вязкого материала (мокрота, гнойное отделяемое ран)

При изготовлении мазков из мокроты для микроскопии следует выбирать участки, содержащие гнойные комочки, в которых с наибольшей вероятностью содержится этиологический агент.

- Мокроту или гнойное отделяемое, нанести на предметное стекло, накрыть другим предметным стеклом. Стекла слегка придавить друг к другу. После этого свободные концы стекол захватить I и II пальцами обеих рук и развести в противоположные стороны; при движении оба стекла должны плотно прилегать друг к другу. Получаются мазки с равномерно распределенным материалом, занимающим большую часть предметного стекла;
- Для облегчения приготовления мазка из густого образца рекомендуется капнуть на предметное стекло 1-2 капли стерильного физиологического раствора и приготовить мазок с помощью второго предметного стекла.

2.5 Приготовление мазка из высохшего биоматериала или малого количества образца

- Добавить в образец 0,5 мл стерильного физиологического раствора или питательного бульона. При необходимости перемешать на вортексе;

- Перенести 1-2 капли стерильной пипеткой Пастера на предметное стекло и кончиком пипетки равномерно распределить капли по поверхности стекла.

2.6 Приготовление мазков из крови

- На предметное стекло, ближе к одному из его концов, нанести каплю крови.

Второе – шлифованное – стекло, которое должно быть уже предметного, поставить на первое под углом 45° и подвести к капле крови до соприкосновения с ней;

- После того как кровь растечется по шлифованному краю, стеклом сделать скользящее движение справа налево, равномерно распределяя кровь тонким слоем по всей поверхности стекла. Толщина мазка зависит от величины угла между стеклами: чем острее угол, тем тоньше мазок. Правильно приготовленный мазок имеет светло-розовую окраску и одинаковую толщину на всем протяжении.

2.7 Приготовление «толстой капли» крови

- На середину предметного стекла пастеровской пипеткой нанести каплю крови. Нанесенную на стекло кровь размазать бактериологической петлей так, чтобы диаметр образующегося мазка составлял 10-15мм. Оставить стекло в горизонтальном положении до подсыхания мазка. Кровь в "толстой капле" распределяется неравномерно, образуя неровный край.

2.8 Приготовление мазков из органов и тканей

Отпечатки образцов ткани делаются на стерильных предметных стеклах до инокуляции культуры. Если стерильные предметные стекла не используются для отпечатков, то их следует делать после инокуляции культуры, чтобы избежать загрязнения:

- Поверхность органа с целью обеззараживания прижечь накалившимися браншами пинцета, сделать по этому месту надрез и из глубины остроконечными ножницами вырезать небольшой кусочек ткани и поместить между двумя предметными стеклами;
- Далее поступить так же, как при приготовлении мазка гнойного отделяемого и мокроты. Если ткань органа плотная, то из глубины разреза сделать скальпелем соскоб. Распределить полученный при соскабливании материал тонким слоем по поверхности стекла скальпелем или бактериологической петлей;
- Для изучения элементов ткани и находящихся в ней микроорганизмов делают мазки-отпечатки. Для этого вырезанный из середины органа небольшой кусочек ткани захватить пинцетом и приложить поверхностью среза к предметному стеклу последовательно в нескольких участках, получая, таким образом, ряд мазков-

отпечатков. Если ткань твердая и не прилипает к предметному стеклу, поместить ткань между двумя предметными стеклами и прижать их друг к другу. Затем, потянув предметные стекла, друг против друга разделить их.

2.9 Приготовление мазков из микробных культур с жидкой питательной среды

- Маленькую каплю исследуемой жидкости нанести бактериологической петлей на предметное стекло и круговыми движениями распределить равномерным слоем в виде кружка диаметром 10-15мм. Мазки должны содержать достаточно материала для полноценного исследования, но не должны быть чрезмерно толстыми, так как во время окрашивания они могут набухать, и содержащиеся в них клетки невозможно будет дифференцировать.

2.10 Приготовление мазка из культур с плотных питательных сред

- На середину чистого хорошо обезжиренного стекла нанести каплю стерильной воды или физиологического раствора, бактериологической петлей в нее внести небольшое количество исследуемой микробной культуры так, чтобы капля жидкости стала слегка мутноватой;
- Излишек микробного материала на петле сжечь в пламени горелки или сбросить одноразовую петлю в плотную непрокаляемую емкость для сбора отходов и приступить к приготовлению мазка по описанному выше способу.

3. Высушивание и фиксирование мазков

Приготовленный на предметном стекле мазок высушивают на воздухе и после полного высыхания фиксируют. При фиксировании мазок закрепляется на поверхности предметного стекла, и поэтому при последующей окраске препарата микробные клетки не смываются. Кроме того, убитые микробные клетки окрашиваются лучше, чем живые.

Различают физический способ фиксации, в основу которого положено воздействие высокой температуры на микробную клетку, и химические способы, предусматривающие применение химических средств, вызывающих коагуляцию белков цитоплазмы.

3.1 Физический способ фиксации

Предметное стекло с препаратом берут пинцетом или I и II пальцами правой руки за ребра мазком кверху и плавным движением проводят 2–3 раза над верхней частью пламени газовой или спиртовой горелки. Время фиксации не должно превышать 5-6 сек, а время прямого воздействия пламени - 2 сек. Надежность термофиксации проверяют следующим простым приемом: свободную от мазка поверхность предметного стекла прикладывают к тыльной поверхности левой руки. При правильном фиксировании мазка стекло должно быть горячим, но не вызывать ощущения ожога.

3.2 Химический способ фиксации

Для фиксации мазков применяют также химические вещества и соединения: этиловый 95⁰ спирт (время фиксации 10-15 мин), метиловый спирт (2-3 мин), ацетон (5 мин), смесь равных объемов абсолютного спирта и эфира по Никифорову (10-15 мин) и др.

Предметное стекло с высушенным мазком погружают в склянку с фиксирующим веществом и затем высушивают на воздухе.

4. Способы окраски препаратов

Используемые в клинической микробиологии многочисленные способы окраски препаратов можно разделить на две группы: ориентировочные простые способы окраски и сложные дифференциальные способы окраски.

4.1 Ориентировочные простые методы окраски

Данными методами пользуются для обнаружения в микроскопируемом материале микробов, определяя их количество, морфологию, расположение. Окрашивание осуществляется в один этап.

Простая окраска заключается в нанесении на мазок какой-либо одной краски на определенный промежуток времени. Чаще всего для простой окраски применяют спирто-водный (1:10) фуксин Пфейффера, леффлеровскую метиленовую синьку и сафранин.

При простой окраске микробные тела воспринимают цвет применяемой краски так же интенсивно, как и ядра клеток; в то же время цитоплазма и весь фон мазка (если это не мазок из чистой культуры) окрашиваются в тот же цвет, но несколько бледнее.

Большинство микробов легко и быстро окрашивается водными или спирто-водными растворами красок.

Препараты, содержащие, кроме бактерий, тканевые и клеточные элементы, красят метиленовым синим. При этом фон препарата окрашивается значительно слабее, чем тела микробных клеток.

4.1.1 Техника окраски мазков

Окраска мазков красящей бумагой. На высушенный и фиксированный препарат наносят несколько капель воды, кладут окрашенные кусочки бумаги величиной 2х2 см. В течение всего времени прокрашивания бумага должна оставаться влажной и плотно прилегать к поверхности стекла. При подсыхании бумагу дополнительно смачивают водой. Продолжительность окрашивания мазка определяется видом окрашиваемого микроба. По окончании окраски бумагу осторожно снимают пинцетом, а мазок промывают водопроводной водой и подсушивают на воздухе или фильтровальной бумагой.

Окраска мазков растворами красителей. Для ориентировочной окраски высушенного и фиксированного над огнем мазка используют один из следующих красителей:

- спиртово-водный раствор метиленового синего - 3–5 минут;
- водный раствор метиленового синего - 5–10 минут;
- метиленовый синий Леффлера - 1–2 минуты;
- разведенный 1:10 карболовый фуксин на фильтровальную бумагу, положенную на фиксированный высушенный мазок для задержки частиц красителя - не более 10–30 с.

Окрашенные препараты промывают водопроводной водой до тех пор, пока в воде не останется следов краски, затем высушивают на воздухе и микроскопируют.

К простым методам окраски относится **обнаружение менингококка в "толстой капле" крови при подозрении на менингококкцемию.** На середину предметного обезжиренного стекла наносят толстую каплю крови диаметром 1,0 см. Стекло оставляют в горизонтальном положении до полного подсыхания крови. Препарат окрашивают водным раствором метиленового синего в течение 2–3 мин (без предварительной фиксации!). После этого осторожно смывают краску водой. Мазок подсушивают на воздухе.

При микроскопии на голубом фоне видны темно-синие ядра лейкоцитов, а между ними – единичные и парные клетки кокков темно-синего цвета.

4.2 Сложные дифференциальные методы окраски

Исследование бактерий в окрашенном препарате дает возможность изучить не только их морфологию, но и позволяет судить о некоторых деталях их химического строения.

Дифференциальные методы окраски предусматривают последовательное проведение следующих процедур:

1. Подготовленный к окраске фиксированный мазок окрашивается первично тем красителем, которым надеются выявить предполагаемый возбудитель инфекции;
2. Протрава мазка химическим соединением, конкретным в каждом отдельном случае – кислотами, спиртом, щелочами, фенолом и пр., целью которой является обесцвечивание всех находящихся в мазке микроорганизмов, кроме искомым потенциальных возбудителей предполагаемого заболевания;
3. Вторичное дополнительное окрашивание краской контрастного цвета. Проведенная ранее протрава способствует прикреплению краски к обесцвеченным клеточным компонентам, и в дополнительный цвет окрашиваются практически все находящиеся в мазке микроорганизмы, кроме возбудителя болезни, для

обнаружения которого применяется конкретный метод обесцвечивания, не влияющий на искомого возбудителя.

4.3 Техническая информация

Правильность выполнения окраски прямо влияет на результат. Стандартизация протоколов минимизирует разброс результатов.

1. Продолжительность окраски зависит от способа, концентрации красящего вещества и других реагентов;
2. Необходимо следовать инструкции производителя при использовании коммерческих наборов;
3. Не рекомендуется использовать водопроводную воду при нанесении мазков или промывке в некоторых видах окрашивания, например, Циля-Нильсена, так как в водопроводной воде могут находиться микробы, что в последствии может привести к ложным результатам. Рекомендуется использовать деионизированную или дистиллированную воду;
4. Чрезмерное промывание мазка между этапами окрашивания может привести к ошибке в окрашивании;
5. Многие лаборатории не придерживаются фиксированного времени обесцвечивания для протоколов окрашивания, и поэтому результаты микроскопии могут отличаться;
6. В некоторых лабораториях обесцвечивающий реагент добавляют по капле, пока он не станет прозрачным. Рекомендуется следовать инструкциям производителя либо своими валидированными методиками.

4.4 Трудности интерпретации результатов окрашивания

Существуют различные факторы, влияющие на результаты микроскопии:

- образец недостаточно гомогенизирован, чтобы разбить скопления клеток, и полученный мазок сложно просматривать;
- частично восприимчивые (или невосприимчивые) к окрашиванию бактерии могут вносить неясность в интерпретацию результатов;
- тип и качество мазка. Слишком толстый мазок не будет читаемым, слишком тонкие могут привести к ложноотрицательным результатам или необходимости повторения процедуры;
- качество подготовки реагентов – проверка сроков годности и концентрации;
- неправильная работа микроскопа.

4.5 Контроль качества

Наборы для многих видов окраски продаются в готовой к использованию форме. При использовании коммерческих наборов важно вести учет партии, количества и дат их использования, а также даты проведения контроля качества.

Каждый раз при окрашивании должны быть использованы положительный и отрицательный контроли. Если метод используется не часто, рекомендуется проводить контроль каждый раз при окрашивании неизвестного микроорганизма. При неудовлетворительном контроле, результат микроскопии является не действительным.

5. Методы окраски

5.1 Окраска по методу Грама

Данный метод окраски позволяет классифицировать бактерии на основе определения их формы, размеров, взаимного расположения клеток, реакции на окрашивание и является основным методом бактериоскопической диагностики инфекционных агентов, а также может использоваться для оценки качества клинических образцов, доставленных на исследование.

В конце XIX столетия датский бактериолог Ханс Христиан Грам предложил метод дифференциальной окраски, разделивший большую часть известных патогенных бактерий на две группы: грамположительные и грамотрицательные.

Грамположительные микроорганизмы содержат в клеточной стенке большое количество тейхоевых и липотейхоевых кислот, связанных с пептидогликанами и образующих многослойную волокнистую структуру. Поэтому при окраске по Граму эти микроорганизмы удерживают комплекс первичного красителя трифенилметилового группы (генциан-, метил-, кристаллического фиолетового).

Грамотрицательные бактерии снаружи покрыты одним слоем пептидогликана, связанного с цитоплазматической мембраной посредством липопroteина, наружная мембрана состоит из липополисахаридов, фосфолипидов и белков. Из-за более высокого содержания липидов клеточные стенки грамотрицательных бактерий имеют повышенную проницаемость, и при обесцвечивании спиртом первичный фиолетовый комплекс красителя легко удаляется через поры клеточной стенки, после чего бактерии приобретают цвет дополнительной окраски: ярко-малиновый при применении фуксина или желто-розовый – сафранина.

Таким образом, отношение к окраске по Граму определяется структурой клеточной стенки микроба.

Спектр окрашивания по Граму включает подавляющее большинство видов бактерий, имеющих то или иное значение в патологии человека, но не все бактерии могут

быть окончательно классифицированы с помощью данного метода. Исключение составляют плохо окрашивающиеся *Leptospira*, не окрашивающиеся *Treponema*, *Mycoplasma*, L-формы бактерий, у которых отсутствует клеточная стенка, а также очень мелкие внутриклеточные паразиты *Chlamidia* и *Rickettsia*. Могут наблюдаться грампеременные (микроорганизмы, которые могут окрашиваться как отрицательно, так и положительно) и грамнеопределенные бактерии (которые не реагируют на окрашивание по Граму и, следовательно, не могут быть определены как грамположительный или грамотрицательный микроорганизм, например, кислостойчивые бактерии).

Некоторые грамположительные бактерии могут проявляться при окраске как грамотрицательные полностью или частично, например, быстрорастущие виды *Streptococcus*, инволюционные формы *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) и некоторые штаммы видов *Bacillus*. Рекомендуется не использовать очень молодые культуры для окрашивания до того, как их рост не станет видимым на чашках с посевами. Некоторые нежные грамотрицательные бактерии, такие как виды *Haemophilus*, можно легко не заметить при окрашивании по методу Грама.

Данный метод окраски используется также для окрашивания некоторых видов грибов, таких как *Candida* и *Cryptococcus*, которые выглядят как грамположительные дрожжи.

5.1.1 Образцы для окраски по методу Грама

1. Клинические образцы.

Предпочтительными образцами для окраски по методу Грама являются мазки из крови, мазки при поражении глаз, мазки из тканей, мазки из отделяемого ран, мазки стерильных в норме жидкостей. Не имеют большой информативной ценности мазки из зева, мазки из носа, мазки мокроты от пациентов с муковисцидозом, мазки из фекального материала;

2. Бульонные культур из жидких питательных сред для определения роста микроорганизмов, морфологии и их тинкториальных свойств при окраске;

3. Колонии микроорганизмов, растущие на твердой питательной среде. Наибольшую информацию дают молодые культуры микроорганизмов (до 24ч) с питательных сред и свежие клинические образцы.

В таблице 1 даны рекомендации по применению окраски по методу Грама для различных биоматериалов.

Таблица 1

Рекомендации по применению окраски по методу Грама

Биоматериал	Окраска по методу Грама
Содержимое полостей организма (жидкости):	+
ликвор (в обычных условиях), ликвор (при наличии шунта)	+
перикардальная жидкость	+
плевральная жидкость	+
перитонеальная жидкость, жидкость после перитонеального диализа	+
синовиальная жидкость	+
пунктат костного мозга	+
жидкость из наружного слухового прохода, жидкость из внутреннего уха	+
Глаза	+
ЖКТ: кал, ректальный тампон	-
Мочеполовой тракт: влагалище/шейка матки	+
уретра/пенис	+
другой материал	+
Скрининговое исследование на стрептококки группы В	-
Верхние дыхательные пути: носоглотка, нос, зев	-
Нижние дыхательные пути: мокрота за исключением муковисцидоза), трахеальный аспират, лаважная жидкость, промывные воды бронхов и соскобы, полученные при бронхоскопии	+
Ткани	+
Моча	-
Рана или абсцесс: материал на тампоне, аспират	+

5.1.2 Безопасность

Процедуру окраски мазков следует проводить в вытяжном шкафу.

Йод, входящий в состав раствора Люголя, токсичен, поэтому следует избегать вдыхания, проглатывания или контакта с кожей.

Этанол и ацетон легко воспламеняются, вызывают раздражение кожи, глаз и интоксикацию при проглатывании или вдыхании в течение длительного периода времени.

5.1.3 Проведение окраски по методу Грама

- На мазок, фиксированный над пламенем горелки, кладут фильтровальную бумагу и наливают избыток основного красителя – карболового кристаллического фиолетового. Прокрашивание продолжается 1–2 минуты;

- Снимают бумагу, сливают остаток красителя и, не промывая препарат водой, наливают раствор Люголя на 1–2 минуты до почернения препарата;
- Раствор Люголя сливают. Предметное стекло обесцвечивают 95% этанолом или ацетоном до тех пор, пока от мазка не перестанут отделяться окрашенные в фиолетовый цвет струйки жидкости;
- Препарат тщательно промывают водопроводной водой;
- Докрашивают водно-спиртовым раствором фуксина в течение 2 минут.

5.1.4 Проведение окраски по методу Грама в модификации по Синеву

В настоящее время более широкое применение в практике микробиологических исследований находит видоизмененный способ окраски Грама по Синеву.

- Основной краситель в виде раствора заменяют фильтровальной бумагой, пропитанной 1 % спиртовым раствором кристаллического фиолетового. На препарат помещают красящую бумажку и наносят на нее 2–3 капли воды.
Окрашивание проводят в течение 1–2 мин;
- Бумагу снимают и дальнейшую окраску препарата ведут общепринятым способом;

5.1.5 Проведение окраски по методу Грама в модификации Г. П. Калины

Данный способ окраски используется для лабораторной диагностики менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. Менингококки, пневмококки, гемофильные палочки хорошо видны после окраски по Граму в модификации Калины.

- На предметное обезжиренное стекло наносят каплю воды, в ней суспендируют культуру. Добавляют каплю спиртового раствора бриллиантовой зелени и размазывают тонким слоем. Диаметр мазка примерно 1,0 см;
- После подсыхания препарат фиксируют над пламенем;
- На фиксированный мазок наливают основной реактив на 1,5–2,0 мин. По истечении указанного времени краску сливают и стекло в наклонном положении промывают вначале водой, затем спиртом (до отхождения облачков краски) и снова водой;
- Промытый препарат докрашивают водным раствором фуксина в течение 2 мин, окончательно промывают водой, подсушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют.

При микроскопии грамотрицательные бактерии выглядят ярко-розовыми, грамположительные – зеленовато-черными или темно-фиолетовыми.

5.1.6 Интерпретация результатов микроскопии мазков, окрашенных по методу

Грама

Грамположительные бактерии окрашиваются основным красителем в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные бактерии, воспринимая дополнительную окраску, приобретают ярко-малиновый цвет.

5.1.7 Контроль качества окраски по методу Грама

1. Рекомендуется ежедневно проверять внешний вид реагентов: если в растворе кристаллического фиолетового образовался осадок необходимо его профильтровать перед использованием;
1. Красители могут быть загрязнены. При подозрении на загрязнение рекомендуется использовать новую партию красителя;
2. Перед использованием новых партий каждой краски и обесцвечивающего реагента необходимо проводить контроль окраски и затем не реже одного раза в неделю, используя для контроля грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы. Для сотрудников лаборатории, которые выполняют окрашивание по Граму нечасто, рекомендуется проверять положительный и отрицательный контроли окраски ежедневно или даже с каждым исследуемым образцом пациента.

Процедура проведения контроля качества окраски:

- приготовить слегка мутную культуру бульона *Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC 25922) и *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC 25923);
- пастеровский пипеткой (по 2 капли на мазок) приготовить мазки, распределив капли по стеклу в овал или круг диаметром 1,0-1,5 см;
- зафиксировать мазки любым из способов и хранить при комнатной температуре в контейнере или любой подходящей емкости;
- окрасить мазки по методу Грама.

Ожидаемые результаты:

- а. Грамотрицательные палочки, розовые;
 - б. Грамположительные кокки, темно-фиолетовые.
1. Если окрашенные мазки оказываются низкого качества, окраску трудно интерпретировать или интерпретация неточна, рекомендуется принимать меры для исправления ошибок;
 2. Неудовлетворительное качество окраски (например, слабое окрашивание грамположительных организмов, удержание кристаллического фиолетового грамотрицательными организмами, окрашивание только краев мазка, осадок на

предметном стекле и т. д.) могут быть вызваны некачественной подготовкой образца, реагентами или процедурой окрашивания;

3. Некоторые наиболее частые причины плохих результатов окрашивания по методу Грама:

- использование предметных стекол, которые не были предварительно очищены или обезжирены;
- слишком толстые мазки;
- перегрев мазков при использовании термофиксации;
- чрезмерное промывание во время окраски, особенно если мазок не был зафиксирован должным образом;
- наличие осадка в реагентах.

5.1.8 Техническая информация

1. Нельзя пользоваться загрязненной фильтровальной бумагой: возможен механический перенос микробов с одного мазка на другой, что может отразиться на результатах микроскопии;
2. Продолжительность воздействия краской, раствором Люголя (протравой) и спиртом зависит от толщины мазка;
3. Важным моментом в окраске по методу Грама является обесцвечивание мазка спиртом. При коротком воздействии спирта получают перекрашенные препараты, а при длительном все микробы (в том числе и грамположительные) обесцвечиваются;
4. На густой, толстый мазок (например, из агаровой культуры) время воздействия спиртом должно быть большим, нежели на тонкий мазок, особенно с жидких культур. При воздействии спиртом на неравномерно приготовленный мазок в толстых его частях микробы останутся необесцвеченными, а в тонких обесцвелятся: получится «пестрая» картина окраски, что может привести к неправильным выводам;
5. Иногда в культуре грамположительных бактерий могут наблюдаться грамотрицательные особи, которых тем больше, чем старше их популяция. Это погибшие бактерии, у которых произошел внутриклеточный автолиз. С другой стороны, в очень молодых культурах (несколько часов роста) из порядка *Enterobacterales* гигантские, юные формы бактерий, которые в 2—3 раза крупнее взрослых особей (18-часовых), при окраске по методу Грама окрашиваются фуксином так интенсивно, что при плохом освещении их можно принять за грамположительные вегетативные формы спороносных палочек;

6. Для начинающих специалистов, а также в сомнительных случаях, рекомендуется на том же стекле, где находится исследуемый мазок, приготовить по сторонам от мазка контрольные препараты — один из культуры микробов, заведомо грамположительных, а другой — из грамотрицательных;
7. При обесцвечивании препарата в окраске по методу Грама спирт можно наливать непосредственно на мазок, постоянно покачивая стекло. Для более полного обесцвечивания препарата рекомендуется использовать емкости, куда наливают спирт и, захватив препарат пинцетом, поднимают и опускают его, следя за цветом стекающего со стекла спирта. Обесцвечивание считается законченным, когда стекающие с мазка капли спирта сравниваются по цвету со спиртом в емкости. Обычно для этого требуется 10—30 секунд, в зависимости от толщины мазка. Спирт 95° в емкости следует регулярно менять, так как разбавленный спирт (80°) может неправильно дифференцировать мазок. Отработанный спирт обычно сливают из емкости в спиртовые горелки;
8. Для специалистов без опыта микроскопирования можно рекомендовать обесцвечивание мазков йодированным спиртом. Установлено, что если к обесцвечивающей жидкости добавить немного йодной настойки, то микробы, окрашивающиеся грамположительно, не обесцвечиваются в такой жидкости даже в течение часа, а грамотрицательные раскрашиваются приблизительно в 5 секунд. Рекомендуется добавить 2—4 мл 10% йодной настойки на 100 мл 95° спирта. Приготовленный раствор может сохраняться долгое время. Для обесцвечивания мазков йодированным спиртом достаточно двух минут, после чего следует промывка водой и дополнительная окраска фуксином (сафранином).

5.1.9 Распространенные ошибки при окраске по методу Грама

Ошибки возникают в зависимости от используемого метода и техники окрашивания и могут привести к отрицательной окраске по методу Грама грамположительных организмов. Они включают:

- мазки слишком густые;
- чрезмерный перегрев во время фиксации;
- низкая концентрация кристаллического фиолетового;
- чрезмерное полоскание между этапами во время процедуры окрашивания. Это может вызвать смывание кристаллического фиолетового или комплекса краситель-йод из грамположительных клеток;
- недостаточное воздействие йода;
- пропущен этап обесцвечивания или недостаточное время обесцвечивания;

- длительное обесцвечивание. Чрезмерное обесцвечивание приведет к ошибочному результату, когда грамположительные клетки могут окрашиваться от розового до красного, что указывает на грамотрицательный результат, а недостаточное обесцвечивание приведет к ошибочному результату, когда грамотрицательные клетки могут казаться синими или фиолетовыми, что указывает на грамположительный результат. Степень необходимого обесцвечивания определяется толщиной мазка;
- чрезмерное контрастное окрашивание;
- неравномерное окрашивание или обесцвечивание из-за недостаточного количества реагента для окрашивания.

5.1.10 Оценка результатов окраски по методу Грама

1. Изучают общую картину препарата под малым увеличением:

- определяют, достаточно ли обесцветился мазок (в зависимости от источника биоматериала задний фон препарата должен быть чистым или окрашенным по грамотрицательному типу;
- если в мазке присутствуют клетки белой крови, они также должны быть полностью грамотрицательными;
- определяют, удовлетворяет ли требованиям толщина мазка (для правильной интерпретации в полях зрения не должно быть более одного слоя клеток, и они не должны накладываться друг на друга).

2. Под малым увеличением также изучают:

- наличие в биоматериале признаков воспаления, обращая внимание на относительное число полиморфноядерных нейтрофилов, мононуклеарных клеток, эритроцитов. У больных с нейтропенией в мазке может быть мало нейтрофилов, но могут присутствовать некротические остатки органических веществ и белок, образующие задний фон препарата;
- также отмечают наличие клеток слущенного эпителия, бактерий нормальной микрофлоры, остатков пищи и т.д., которые могут свидетельствовать о неправильном взятии материала;
- кроме того, под малым увеличением лучше выявляются некоторые микроорганизмы: паразиты, ветвящиеся гифы грибов и др.

3. Для мазков, приготовленных из клинических образцов, при малом увеличении, для доказательства воспаления рекомендуется исследовать несколько полей зрения (для мочи 10, для других образцов от 20 до 40);

4. Если клетки воспаления присутствуют, определяют среднее количество лейкоцитов и эпителиальных клеток в 20-40 репрезентативных полях зрения, содержащих клетки;
5. В репрезентативной области мазка с преобладанием воспаления рекомендуется изучить 20-40 полей зрения под иммерсионным объективом на наличие микроорганизмов, оценки морфологии клеток и их реакции на окраску;
6. При отсутствии микроорганизмов выдают отрицательный ответ;
7. Если микроорганизмы в мазках обнаружены, указывают их **характер окраски**

по Граму:

- Грам(+): темно-фиолетовые;
- Грам(-): розовые или красные;
- Грамвариабельные: часть клеток грамположительные, часть - грамотрицательные; это может быть в результате неадекватной толщины мазка, неполного или чрезмерного обесцвечивания, присутствия старых клеток с нарушенной клеточной стенкой, или обусловлено истинной грамвариабельностью некоторых бактерий;
- Грамнейтральные: эти клетки выглядят бесцветными на грамотрицательном заднем фоне и могут иметь внутриклеточное расположение (такую картину можно наблюдать в присутствии элементов грибов или *Mycobacterium* spp.).

Морфологию микроорганизмов. Различают следующие формы бактериальных клеток: кокки, коккоподобные, коккобациллярные, палочки, нити, дрожжеподобные.

Концы клеток по внешнему виду могут быть: закругленные, уплощенные, булабовидные (вздутые), вогнутые.

Стороны клеток могут быть: параллельными, овоидными (выпуклыми), вогнутыми, неравномерными.

По направлению оси клетки имеют прямую, изогнутую или спиралевидную форму.

У **полиморфных** (плеоморфных) клеток форма варьирует. Обычно используемый термин “**дифтероиды**” или “**коринеформные бактерии**” подразумевает грам(+) бактерии, которые характеризуются полиморфизмом, булабовидной формой или неравномерным окрашиванием, либо имеют угловое расположение (V и L) и/или в виде частокола.

8. Отмечают **общий размер** клеток: мелкие или крошечные (<0,3 $\mu\text{м}$), малый (~0,3-0,5 $\mu\text{м}$), средний (до 1 $\mu\text{м}$) и крупный (более 1 $\mu\text{м}$) размер (для сравнения средний размер эритроцита 7 $\mu\text{м}$, а цитоплазматических гранул в нейтрофилах -

0,2-0,3 мкм). По длине различают короткие (~0,5-1 мкм), средние, длинные, нитевидные (10-30 мкм) клетки. По толщине клетки могут быть тонкими, средними, толстыми.

9. В мазке клетки располагаются одиночно, парами, цепочками, тетрадами, гроздьями, частоколом, в виде китайских иероглифов, пакетами, под углом и т.д. В каждой лаборатории может быть принята своя отработанная форма описания микроорганизмов в окраске по методу Грама. Для количественной характеристики микроорганизмов рекомендуется использовать одну из двух шкал оценки, которые представлены в таблице 2).

Таблица 2

Шкалы оценки для количественной характеристики микроорганизмов

В баллах	Описательная шкала
1+ (<1 в поле зрения)	Единичные клетки (≤ 1 в поле зрения)
2+ (1 в поле зрения)	Мало клеток (2-5 в поле зрения)
3+ (2-10 в поле зрения)	Среднее число клеток (6-10 в поле зрения)
4+ (>10 в поле зрения)	Много клеток (>10 в поле зрения)

После интерпретации результатов окраски по методу Грама препараты следует сохранить на случай проведения дополнительной экспертизы, например, при несовпадении с данными культуральной диагностики. Для этого необходимо аккуратно удалить избыток масла, а при более длительном хранении (например, при создании коллекции препаратов) масло удаляют раствором ксилена и стекло предохраняют от пыли изоляционной пленкой.

Если необходимо перекрасить препарат или требуется другой способ окраски, а приготовить новый препарат не представляется возможным, удаляют масло раствором ксилена, обесцвечивают мазок смесью спирта с ацетоном, затем перекрашивают его.

5.1.11 КОН-тест для уточнения сомнительных результатов окраски по методу Грама

Обычно оценка результатов окраски по методу Грама не представляет сложности. Однако, в отдельных случаях грамположительные микроорганизмы, например спороносные палочки, приобретают грамтрицательную окраску, тогда как некоторые штаммы грамтрицательных бактерий родов *Acinetobacter* и *Moraxella* имеют тенденцию не обесцвечиваться спиртом, вследствие чего выглядят как грамположительные.

Для уточнения таких сомнительных результатов японский ученый Е. Куи в 1938 г. предложил КОН-тест (тест Греггерсена). В основе этого теста лежит способность

клеточных стенок грамположительных бактерий, в отличие от грамотрицательных, сохранять целостность при воздействии на них гидроксида калия (KOH).

5.1.12 Проведение КОН-теста

- Петлю суточной агаровой культуры испытуемого штамма суспендировать на предметном стекле в капле 3 % раствора КОН;
- При положительной реакции, свойственной грамотрицательным микроорганизмам, через несколько секунд жидкость в капле приобретает слизистую консистенцию, и при отрыве петли от предметного стекла слизистые нити тянутся на 0,5–2,0 см;
- Учет результатов пробы рекомендуется проводить на темном фоне. Приобретение грамотрицательными бактериями слизистой консистенции при обработке их гидроксидом калия связывают с выходом из клеток ДНК, представляющей собой вязкий компонент.

5.2 Окраска кислотоустойчивых микобактерий по методу Циля-Нильсена

Кислотоустойчивыми (КУМ) называют микробы, которые, будучи окрашенными карболовым фуксином, не обесцвечиваются под действием концентрированных минеральных кислот.

Особенностью микробов этой группы является то, что они плохо воспринимают окраску. Это свойство обусловлено наличием в клеточной стенке и цитоплазме кислотоустойчивых бактерий длинных цепочек жирных миколовой, туберкулостеариновой и других кислот с 50–100 атомами, которые делают клеточную стенку микроорганизма непроницаемой для кристаллвиолета и других красителей. Поэтому, чтобы обеспечить проникновение краски в клеточную стенку этих бактерий, применяют более концентрированные растворы красок в подогретом состоянии с добавлением детергентов и удлинением сроков окраски. После того как краска введена в клетку, ее нельзя обесцветить обычными кислотными и спиртовыми растворителями.

Для окрашивания кислотоустойчивых бактерий применяют обычно окраску по методу Циля–Нильсена.

5.2.1 Безопасность

Оптимальным является приготовление мазков под вытяжкой или в боксе биологической безопасности 2 класса с наличием вытяжного устройства.

Входящий в состав карбол-фуксина для методов Циля-Нильсена фенол - опасное химическое вещество.

Термофиксация не убивает виды *Mycobacterium*, поэтому необходимо обращаться с мазками осторожно.

5.2.2 Проведение окраски по методу Циля-Нильсена

- Фиксированный на пламени горелки мазок окрашивают в течение 3–5 минут раствором карболового фуксина Циля или окрашенной фуксином бумажкой с подогреванием до появления паров, но не доводя краситель до кипения (Внимание: перегрев вызывает разбрызгивание красителя и может привести к растрескиванию предметного стекла);
- Дают препарату остыть, бумажку снимают, сливают избыток красителя, препарат промывают водой;
- Окрашенный препарат обесцвечивают 5 % раствором серной кислоты в течение 3–5 с или 95 % этиловым спиртом, содержащим 3 % по объему хлористоводородной кислоты (HCl), несколько раз погружая стекло с мазком в стаканчик с солянокислым спиртом;
- После обесцвечивания остаток кислоты сливают и тщательно промывают препарат водой;
- Докрашивают дополнительно метиленовым синим Леффлера или малахитовым зеленым 3–5 мин;
- Окрашенный препарат промывают водой, подсушивают и микроскопируют.

При окраске препаратов по методу Циля–Нильсена кислотоустойчивые бактерии окрашиваются фуксином в рубиново-красный цвет и не обесцвечиваются кислотой.

Некислотоустойчивые бактерии, а также элементы ткани и лейкоциты под действием кислоты обесцвечиваются и приобретают цвет дополнительного красителя.

5.2.3 Интерпретация результатов окраски по методу Циля–Нильсена

Положительный результат

Кислотоустойчивые бациллы имеют длину 0,5-10 мкм и окрашиваются фуксином в рубиново-красный цвет и не обесцвечиваются кислотой.

Отрицательный результат

Все другие организмы и фон окрашиваются в зеленый цвет, если использован малахитовый зеленый, или синий цвет, если используется метиленовый синий.

Микроорганизмы контроля качества

Положительный контроль

Виды *Mycobacterium*

Отрицательный контроль

Проверенный отрицательный мазок можно использовать в качестве отрицательного контроля.

5.3 Окраска по методу Романовского-Гимзе

Метод окраски микропрепаратов по Романовскому-Гимзе - это один из самых популярных методов окрашивания при изучении морфологии спирохет, риккетсий, хламидий, простейших, а так же клеточных структур и тканей самых различной структуры. Данный метод используется, в том числе, и для исследований мазков крови посредством световой оптической микроскопии.

Посредством данного метода ацидофильные образования окрашиваются в разные оттенки красного цвета. Образования базофильного характера окрашиваются в цвет от пурпурного до синего.

5.3.1 Проведение окраски по методу Романовского-Гимзе

- Перед началом окрашивания готовый жидкий краситель разводят в дистиллированной воде в соотношении 1-2 капель красителя на 1 мг воды. Мазки окрашивают во влажной камере при температуре 37 °С в течение 20-25 минут. После завершения окраски мазки промывают проточной водой, сушат на воздухе, а затем исследуют с помощью масляных импрессий;
- Мазки, акцентированные в метиловом спирте, окрашивают на протяжении 40-120 минут раствором, в состав которого входят 1 мл приготовленной краски жидкой формы, 2 мл главного буферного раствора и 47 мл дистиллированной воды. Ополаскивание проводят в дистиллированной воде, затем высушивают и изучают при иммерсии.

Результаты окрашивания:

Бактерии вследствие окрашивания приобретают фиолетово-красный оттенок, цитоплазма клеток — голубой цвет, ядра — красный. Вследствие окраски простейших их цитоплазма становится голубого цвета, а ядра — красно-фиолетового.

5.4 Окраска калькофлуором белым

Окраска калькофлуором белым (КФБ) проводится для прямого исследования большинства образцов с использованием флуоресцентной микроскопии. Представляет собой быструю неспецифическую флюорохромную окраску.

Использование калькофлуора белого, флуоресцентного отбеливателя, с добавлением гидроксида калия (КОН) улучшает визуализацию элементов грибов в микроскопических мазках. КФБ неспецифически связывается с хитином и целлюлозой в клеточной стенке грибка и флуоресцирует от ярко-зеленого до синего в зависимости от используемых ультрафиолетовых фильтров. Следует ожидать неспецифической флуоресценции клеточных материалов человека, природных и синтетических волокон.

КФБ выделяет подозрительные структуры, но интерпретация опирается на традиционные морфологические особенности грибов.

Краситель КФБ может использоваться в клинической микологии и паразитологии:

- Для обнаружения амёб путем выявления их цист;
- Окрашивание рубцов почеч дрожжевых клеток с более высоким содержанием хитина, с целью определения количества рубцов и возраста клетки;
- КФБ может также использоваться для усиления реакции дрожжей в мазке по методу Папаниколау;
- Окраска КФБ, как неспецифический флуорохром, который связывается с хитином и клеточными стенками целлюлозы, была описана как самый быстрый метод обнаружения патогенных грибов и дрожжей, таких как *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*), *Microsporidium*, *Acanthamoeba*, *Naegleria* и *Balamuthia*, *Cryptosporidium*;
- Обнаружение *Candida* в раковых и предраковых поражениях с использованием КФБ под флуоресцентной микроскопией.

Препараты КОН-КФБ можно хранить в течение нескольких дней при 4°C во влажной емкости.

5.4.1 Проведение окраски калькофлуором белым

Для обнаружения элементов грибов и дрожжей:

1. Поместить образец на чистое предметное стекло и дать высохнуть при температуре более 60°C;
2. Добавить 1 каплю гидроксида калия (10%) и аккуратно перемешать;
3. Добавить 1 каплю калькофлуора белого и аккуратно перемешать;
4. Накрыть предметное стекло чистым покровным стеклом и исследовать образец под флуоресцентным микроскопом. Наблюдать флюоресценцию и типичную морфологию.

Для обнаружения цист *Acanthamoeba*:

1. Поместить образец на чистое предметное стекло и дать высохнуть на воздухе.

Образцами для приготовления мазка могут быть соскобы или биопсии роговицы, конъюнктивы или язвы роговицы, принадлежности контактных линз и концентрированные водные образцы (не менее 100 мл.). В случае распространенной инфекции для микроскопии могут использоваться и другие образцы биоматериалов;

2. Зафиксировать мазок в метаноле в течение 2 минут;
3. Добавить 1 каплю гидроксида калия (10%) и аккуратно перемешать;
4. Добавить 1 каплю калькофлуора белого и аккуратно перемешать;

5. Окрашивать 5 минут. Удалить излишки красителя полосканием в деминерализованной воде. Накрыть предметное стекло чистым покровным стеклом и исследовать образец под флуоресцентным микроскопом. Наблюдать флюоресценцию и типичную морфологию.

Для обнаружения *Microsporidia*:

1. Для микроскопии микроспоридий пригодны образцы свежего стула, дуоденальные аспираты, концентрированная моча, мокрота, СМЖ, назальное отделяемое, отделяемое конъюнктивы. Образец тонким слоем поместить на чистое предметное стекло и дать высохнуть горячим способом при температуре более 60°C до высыхания;
2. Фиксировать мазок в метаноле в течение 2 минут;
3. Добавить 1 каплю гидроксида калия (10%) и аккуратно перемешать;
4. Добавить 1 каплю калькофлуора белого и аккуратно перемешать;
5. Окрашивать в течение 1 минуты. Удалить излишки красителя полосканием в деминерализованной воде. Накрыть предметное стекло чистым покровным стеклом и исследовать образец под флуоресцентным микроскопом. Наблюдать флюоресценцию и типичную морфологию.

Для обнаружения *P. carinii*:

1. Концентрированный БАЛ или образцы тканей являются наиболее предпочтительными для микроскопии, т.к. при использовании индуцированной мокроты наблюдается снижение обсемененности пневмоцистами. Поместить образцы на чистое предметное стекло и высушить на воздухе;
2. Зафиксировать мазок в метаноле в течение 2 минут;
3. Добавить 1 каплю гидроксида калия (10%) и аккуратно перемешать;
4. Добавить 1 каплю калькофлуора белого и аккуратно перемешать;
5. Окрашивать в течение 1 минуты. Удалить излишки красителя полосканием в деминерализованной воде. Накрыть предметное стекло чистым покровным стеклом и исследовать образец под флуоресцентным микроскопом. Наблюдать флюоресценцию и типичную морфологию.

5.4.2 Интерпретация результатов окраски калькофлуором белым

Положительный результат

Элементы грибов, дрожжи — яркая яблочно-зеленая флуоресценция с типичной морфологией.

Acanthamoeba cysts — появляются цисты, гофрированные и с двойной стенкой с яркой яблочно-зеленой флуоресценцией и ярко оранжевой цитоплазмой.

Microsporidia - яблочно-зеленая флуоресценция, споры кишечных микроспоридий варьируются от 0.9-1.5мкм до 1.2-2.0мкм, клеточная стенка яркая, но окрашивание неспецифично.

P. carinii – бриллиантовая яблочно-зеленая флуоресценция, цисты 5-8мкм в диаметре и содержат до 8 серповидных или плеоморфных спорозоидов, клеточную стенку и двойные скобообразные структуры внутри цист, окрашиваются интенсивно.

Отрицательный результат

Бактерии (типичная кокковая или бациллярная форма) – слабы к флюоресценции, и флуоресценции не наблюдается.

5.4.3 Контроль качества окраски калькофлуором белым

Проведение контроля качества должно осуществляться в соответствии с принятыми в лаборатории требованиями проведения контрольных процедур. Если контроль качества дает аномальные результаты, результаты исследования не сообщаются.

Микроорганизмы контроля качества

Положительный контроль

Суспензия дрожжей или плесени, например, *Candida* spp. или *Aspergillus* spp.

Отрицательный контроль

E. coli ATCC® 25922 - флуоресценции не наблюдается.

5.4.4 Техническая информация / ограничения

1. Калькофлуор белый является флуоресцентным красителем, помогающим выявлять определенные микроорганизмы благодаря морфологическим особенностям. Окончательная идентификация может потребовать дополнительных биохимических или серологических тестов, или подтверждения другой техникой окрашивания;
2. Капсулы *Cryptococcus* не окрашиваются калькофлуором белым. Для выявления указанного организма необходима другая техника окрашивания;
3. Различные типы примесей в мазке могут светиться. Бактерии также могут светиться, но менее ярко, чем грибы;
4. Оба реагента – гидроксид калия (10%) и калькофлуор белый должны быть добавлены для адекватной флуоресценции *P. carinii*, *Acanthamoeba*, и микроспоридий;
5. Индуцированная флуоресценция исчезает при длительном просмотре, особенно тонких образцов, но может быть восстановлена;
6. Если образец содержит чрезмерное количество примесей или дрожжей, для дальнейшего исследования следует выбрать другой метод окрашивания;

7. Важно, чтобы образцы ногтей были предварительно размягчены перед добавлением калькофлуора, иначе краситель не сможет проникнуть в ткань.

5.5 Другие способы окраски

По сравнению с окраской по методу Грама, окраской кислотоустойчивых бактерий по методу Циль-Нильсена, окраской по методу Романовского-Гимзе другие способы окраски имеют ограниченное диагностическое значение и не так часто используются в практической лабораторной практике. Другие способы окраски представлены в таблице 3.

Таблица 3

Характеристика способов окраски

Цель окраски	Способ окраски	Этапы окраски	Результат
Выявление капсул	По Бурри	1. В центр стекла вносят каплю туши и перемешивают петлей с каплей культуры; 2. Делают мазок ребром покровного стекла, высушивают и микроскопируют	На черном фоне видны неокрашенные бактерии, капсулы
	По Гинсу	1. Фиксируют окрашенный тушью по Бурри мазок 2. Красят карболовым фуксином 5-10 мин. и промывают водой	Бактерии красные, фнн черный, капсулы неокрашенные
Выявление спор	По Ожешко	1. На нефиксированный мазок наливают 0,5% р-р соляной кислоты и подогревают 1-2 мин; 2. Сливают кислоту, промывают водой и фиксируют препарат; 3. Окрашивают по Циллю-Нильсену	Тела бактерий синего цвета, споры красного цвета
Окраска зерен волютина	По Нейссеру	1. Фиксированный на пламени горелки мазок окрашивают 1–2 минуты синькой Нейссера; 2. Синьку сливают, на препарат наносят несколько капель раствора Люголя на 1 минуту; 3. Мазок промывают водой, подсушивают; 4. Докрашивают раствором хризоидина или везувина на 2–3 минуты; 5. Промывают водой, подсушивают,	Зерна волютина, расположенные на полюсах клетки, окрашиваются в синий цвет, тела микробных клеток – в светло-коричневый

		микроскопируют	
Окраска <i>Borrelia vincentii</i> (спирохеты, вызывающей ангину Винсента)	По Винсенту	Метод окраски Винсента аналогичен методу Грама, за исключением того, что контрастная окраска (1% карболовый фуксин) наносится на 30 сек.	Наличие большого количества <i>Borrelia vincentii</i> в ассоциации с фузиформными бациллами, грамотрицательными палочками и полиморфноядерными лейкоцитами указывают на инфекцию. <i>Borrelia vincentii</i> выглядит как бледно-розовая спираль вместе с розовыми сигарообразными фузиформами. Примечание: для постановки диагноза необходимо присутствие обоих организмов

6. Применение покрасочных камер для окраски мазков

Покрасочные камеры являются медицинскими изделиями и предназначены для автоматической окраски мазков крови, цитологических, микробиологических и других биологических препаратов на предметных стёклах по заданной программе. Покрасочные камеры позволяют оптимально организовать в лаборатории рабочее место по окраске мазков.

Покрасочные камеры должны иметь регистрационное удостоверение дающее право применения в Российской Федерации в установленном порядке и эксплуатироваться в соответствии с инструкцией производителя. В покрасочных камерах возможна реализация наиболее востребованных методик окраски: по методу Романовского-Гимзе, методу Грама, методу Циля-Нильсена и других.

6.1 Проведение окраски мазков в покрасочной камере

1. Подготовка мазков к покраске осуществляется в соответствии с п.2 настоящего документа;
2. Фиксация и окраска мазков в покрасочной камере осуществляется групповым методом – предметные стёкла для окраски размещаются горизонтально или вертикально. Окрашивание производится путём последовательного программируемого перемещения штатива с предметными стёклами из

исходных парковочных станций, в технологические станции, где проводится обработка препаратов (фиксация, окраска, промывка, сушка и пр.) в соответствии с заданной технологической программой;

3. После обработки штативы с обработанными стёклами возвращаются в исходную парковочную станцию и готовы для проведения микроскопии;

Контроль качества окраски в покрасочных камерах осуществляется аналогично процессу проведения контроля качества при ручном окрашивании мазков, описанных в настоящем документе выше.

6.2 Безопасность работы покрасочной камеры

- Рабочая камера покрасочных камер замкнутая и находится под небольшим разрежением, что исключает выброс паров метанола (или других вредных веществ) в рабочее помещение лаборатории;
- Имеются электронные блокировки от разлива жидкости, от работы с незакрытой крышкой, противопожарные блокировки и другие.

7. Список литературы

1. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Щербаков А.А., Карпунина Л.В. Методы общей бактериологии; Ульяновск; ГСХА; 2008; 130 с.
2. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований; Москва; 1978
3. М. Н. Зубков Сбор, транспортировка биологического материала и трактовка результатов микробиологических исследований. – Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т. 6. - № 2. – с. 143 – 154
4. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., Иванова С.М. Руководство по медицинской микробиологии; Москва; БИНОМ; 2010г.
5. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. МУК 4.2.4067-24, Москва, 2024г.
6. Марри П.Р., Шей И.Р., Клиническая микробиология. Краткое руководство; Москва; «Мир» 2006; 425с.
7. Isenberg H. Clinical Microbiology Procedures Handbook.-2010.- Am.Soc.for Microbiol.-Washington, D.C.
8. European manual of clinical microbiology – 1st edition / editors Cornaglia G., Courcoul R., Herrmann J.-L., Kahlmeter G., Peigue – Lafeuille H., Vila J. – 2012.
9. Manual of clinical microbiology — 11th edition / editors in chief, James H. Jorgensen, Michael A. Pfaller; volume editors, Karen C. Carroll [and 4 others]. – 2015 p.774.

10. J. Michael Miller,¹ Matthew J. Binnicker, Sheldon Campbell, et al. Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2024 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)
11. Issued by the Standards Unit, UK Standards for Microbiology Investigations, Staining procedures UKHSA Test Procedures; TP 39; 2025r.; Page: 1 of 56.
12. Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover. 1995. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. ASM, Washington, D.C.
13. Clark, G. 1981. Staining Procedures. 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore MD.