

## ТВ Циль-Нильсена

### Предназначение

Окрашивание на туберкулез (ТБ) используется для окрашивания культур или образцов, предположительно содержащих микобактерии, с целью ранней диагностики микобактериальной инфекции и ее характеристик. Только для диагностики in vitro. Только для профессионального использования.

### Клиническое значение

Использование красителей на ТБ полностью принято как процедура ранней диагностики инфекции микобактериями, а также для получения информации о бактериальной нагрузке в образце.

Несмотря на то, что большинство кислотоустойчивых микроорганизмов являются микобактериями, эта особенность также присутствует у других бактерий, таких как *Nocardia* и некоторых паразитов, таких как *Cryptosporidium*.

### Принцип

Красители на туберкулез (ТБ) используются для дифференциации кислотоустойчивых микроорганизмов. Эти микроорганизмы имеют особую липидную клеточную стенку, содержащую миколиновую кислоту. Это позволяет стенке противостоять обесцвечиванию кислотно-спиртовым раствором после окрашивания основными красителями, такими как карбол-фуксин.

Таким образом, клеточная стенка этих микроорганизмов приобретает красновато-розовый цвет, а остальные окрашиваются контрастным красителем. Предполагается, что проницаемость интактных мембран играет важную роль в механизме кислотно-спиртовой устойчивости.

Окрашивание по хинину - это вариант классической процедуры окрашивания по Циль-Нильсену, при которой в качестве основного красителя используется фуксин с высокими концентрациями фенола, что позволяет окрашивать холодным способом. С другой стороны, процедура Циль-Нильсена требует тепла во время фазы первичного окрашивания.

### Состав реагента

#### А. Карболовый Фуксин (1 x 250 мл):

|                |      |
|----------------|------|
| Базовый Фуксин | 0,2% |
| Фенол          | 4,6% |

#### В. ТВ Обесцвечивающий раствор (1 x 250 мл):

|        |     |
|--------|-----|
| Этанол | 97% |
| НСI    | 3%  |

#### С: Метиленовый синий Кюне (1 x 250 мл):

|                   |      |
|-------------------|------|
| Метиленовый синий | 0,5% |
| Фенол             | 1%   |
| Этанол            | 30%  |

### Меры предосторожности:

Карболовый фуксин: Опасность. H226 - Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. H314 - вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз. H341 - Предположительно вызывает генетические дефекты. P210 - Беречь от тепла, горячих поверхностей, искр, открытого огня и других источников возгорания. Не курить. P260 - Избегать вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / аэрозолей. P264 - После работы тщательно вымыть. P280 - Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз / лица. P310 - Немедленно обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР / к врачу. P305+P351+P338 - ПРИ

ПОПАДАНИИ В Г ЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P370 + P378 - В случае пожара: использовать средства, описанные в пункте 5 Паспорта безопасности.

Обесцвечивающее средство ТВ: Опасность. H225 - Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. P210 - Беречь от тепла, горячих поверхностей, искр, открытого огня и других источников возгорания. Не курить. P233 - Держать контейнер плотно закрытым. P280 - Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз / лица. P303 + P361 + P353 - ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): немедленно удалить / снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой / принять душ. P370 + P378 - В случае пожара: использовать средства, описанные в пункте 5 Паспорта безопасности. P403 + P235 - Хранить в хорошо вентилируемом месте. Хранить в прохладном месте. P501 - Утилизируйте содержимое / контейнер в соответствии с пунктом 13 Паспорта безопасности.

Метиленовый синий Кюне: Предупреждение. H226 - Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. H315 - вызывает раздражение кожи. H319 - вызывает серьезное раздражение глаз. H341 - Предположительно вызывает генетические дефекты. P201 - Перед использованием получить специальные инструкции. P210 - Беречь от тепла, горячих поверхностей, искр, открытого огня и других источников возгорания. Не курить. P280 - Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз / лица. P362+P364 - Немедленно снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием. P370 + P378 - В случае пожара: использовать средства, описанные в пункте 5 Паспорта безопасности. P403 + P235 - Хранить в хорошо вентилируемом месте. Хранить в прохладном месте. P501 - Утилизируйте содержимое / контейнер в соответствии с пунктом 13 Паспорта безопасности.

Утилизируйте неиспользованный или испорченный продукт и отходы в соответствии с местным законодательством

### Приготовление

Все реагенты готовы к использованию.

### Хранение и стабильность

Реагенты будут оставаться стабильными до истечения срока годности, указанного на этикетке, при хранении при температуре 15-30°C в защищенном от света месте.

Емкости всегда нужно держать плотно закрытыми.

Для некоторых реагентов со временем может образовываться легкий осадок. Это, тем не менее, не влияет на их функциональность.

### Дополнительное необходимое оборудование, не включенное в набор

- Стандартное лабораторное оборудование и материалы для микробиологии, такие как предметные стекла для микроскопии, горелка Бунзена, посевная петля и фильтровальная бумага.

- Устройство для окрашивания (ручное или автоматическое)

- Микроскоп с иммерсионным объективом

### Образцы

Мазки бактериальных культур. Образцы различных жидкостей организма: мокрота, легочная жидкость, осадок мочи, спинномозговая жидкость, ткани и т. д.



Распределите образец с помощью посевной петли на предметном стекле, чтобы получить однородный и тонкий мазок. Высушите на воздухе и закрепите нагреванием, пропустив слайд через слабое пламя 2 или 3 раза. Перед окрашиванием дайте остыть.

Обращайтесь с образцами осторожно из-за их потенциально инфекционной природы.

### **Процедура теста**

1. Поместите мазок на окрашивающий мостик и накройте его фильтровальной бумагой. Смочите Карболовым фуксином. Дать постоять 5-10 мин.  
В течение этого периода и время от времени нагревайте до появления паров красителя, но не кипятите и не допускайте высыхания препарата.
2. Мягко промойте под водопроводной водой и слейте излишки воды.
3. Снимите фильтровальную бумагу, накройте ТВ Обесцвечивающим раствором и осторожно поверните мазок. Смойте водой. Если красное окрашивание все еще присутствует в образце, повторите этап обесцвечивания.
4. Мягко промойте под водопроводной водой и слейте излишки воды.
5. Покройте предметное стекло метиленовым синим Кюне примерно на 1 мин.
6. Промойте водой и высушите на воздухе.
7. Осмотрите под микроскопом с иммерсионным объективом.

### **Интерпретация результатов**

Спирто-кислотоустойчивые бактерии: от темно-красного до розового.

Не спирто- и кислотоустойчивые бактерии: синий.

### **Примечания**

Результат окрашивания ТБ следует рассматривать как ориентир. Положительное окрашивание является предполагаемым доказательством присутствия микобактерий в образце и должно быть подтверждено дополнительными тестами (посев, молекулярные тесты и т. д.). Отрицательное

окрашивание не обязательно означает, что образец отрицательный на микобактерии.

Описанная выше методика может быть изменена в соответствии с предпочтениями техника, чтобы получить изменения в интенсивности окрашивания. Это влечет за собой изменение времени окрашивания, обесцвечивания и полоскания. Если для полоскания используется проточная вода из-под крана, имейте в виду, что сильно хлорированная вода может ослабить контрастное окрашивание.

Чрезмерное полоскание после добавления фуксина может дать ложноотрицательный результат. Чрезмерное полоскание после контрастного окрашивания может уменьшить окрашивание неокислотных микроорганизмов.

Клинический диагноз не следует ставить на основании одного результата теста; он должен включать клинические и другие лабораторные данные.

### **Контроль качества**

Рекомендуется использовать образцы QC, чтобы оценить соответствующее окрашивание компонентов образца. Каждая лаборатория должна разработать свою собственную схему контроля качества и корректирующие действия, если средства контроля не соответствуют установленным критериям.

Мы рекомендуем следовать методам контроля качества, определенным CLSI.

Для этого проводят контроль с помощью микроорганизмов ATCC или других ранее охарактеризованных контрольных штаммов.

### **Библиография**

1. Gurr, E. (1965). "The rational uses of dyes in Biology". Leonard Hill, London.
2. Clark, G. (1981) "Staining Procedures", pp.380-382, 4th ed. Williams & Wilkins.
3. CLSI Guidelines and Standards, CLSI, Wayne, P.A.
4. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).

**02.2021, Rev. 9.0**

