

УДК 504.055(043.5)

А.А. Ковалёва

*ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова
НАМН Украины», г. Харьков*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ОКРАСКИ МИКОБАКТЕРИЙ И ПЕРСПЕКТИВА УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Приведены сведения о составе, строении и отличительных структурных элементах микробной клетки микобактерий, представлены различные способы окраски кислотоустойчивых бактерий, рассмотрены особенности, на которые следует обращать внимание, чтобы избежать ошибок при проведении бактериоскопического исследования.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, миколовые кислоты, карболовый фуксин.

Микобактерии уже более 120 лет служат объектом пристального внимания исследователей. После того как Р. Кох в 1882 г. открыл возбудитель туберкулеза, начались многочисленные поиски этих микробов в патологическом материале и окружающей среде. Р. Кох предполагал, что кроме собственно туберкулезной палочки в природе существует много других, близких к ней, бактерий. Это предположение вскоре подтвердилось многочисленными авторами, которые находили микроорганизмы, внешне весьма похожие на микобактерии, на самых разных субстратах: сливочном масле, траве, в почве, воде, воздухе, молоке и т. д. [1, 2].

Род *Mycobacterium* с включением в него видов *M. tuberculosis* и *M. leprae* в систематику бактерий предложили ввести в 1896 г. К.В. Lehmann и R. Neumann. Вскоре стали появляться сообщения об открытии других представителей этого рода — сапрофитных бактерий, широко распространенных в природе. В настоящее время род *Mycobacterium* включает свыше 200 видов. В последнем издании классификации Берджи (9-е издание) группа 21 (микобактерии) включает 45 видов, из которых большинство представлены сапрофитами, непатогенными для человека.

Род *Mycobacterium* семейства *Mycobacteriaceae* отдела *Firmicutes* представляет со-

бой неподвижные аэробные грамположительные палочковидные бактерии. Иногда они образуют нитевидные структуры, напоминающие мицелий грибов. Именно поэтому они и были названы *Mycobacterium* (греч. *mykes* — гриб и лат. *bacterium* — бактерия).

Типичным представителем рода микобактерий являются *M. tuberculosis* — тонкие, слегка изогнутые, гомогенные или зернистые палочки длиной от 0,8 до 3–5 мкм и шириной от 0,3 до 0,5 мкм. Форма и зернистость микобактерий хорошо видны в окрашенных препаратах. По особенностям морфологии возбудитель туберкулеза следует расположить между коринебактериями и проактиномицетами (нокардиями). Мицелий они не образуют, растут в виде слабоветвящихся клеток неправильной формы. В молодых культурах палочки более длинные, в старых — склонны к ветвлению. Бактерии туберкулеза способны образовывать L-формы, сохраняющие способность к инфицированию [3].

Структурный скелет клеточной стенки микобактерии представляет собой два ковалентно связанных полимера — миколат арабиногалактана и пептидогликан, к которому присоединены белки, полисахариды, липиды. Такой сложный химический комплекс с высоким содержанием липидов придает клеткам микобактерии туберкулеза ряд ха-

© А.А. Ковалёва, 2012

рактерных свойств: устойчивость к кислотам, щелочам и спирту, а также гидрофобность [4].

Микобактерии грамположительны, неподвижны. От коринебактерий они отличаются кислотоустойчивостью — после окрашивания фуксином не обесцвечиваются под действием концентрированных минеральных кислот и спиртов. На этом свойстве основана их дифференциальная окраска. В 1882 г. Пауль Эрлих обнаружил, что *M. tuberculosis* после окраски анилиновыми красителями не удается обесцветить кислотой. Франц Циль — немецкий бактериолог, профессор университета в Любеке, — продолжая работы Пауля Эрлиха, создал в 1882 г. карбол-фуксиновый краситель для окрашивания возбудителя туберкулеза, а в 1883 г. совместно с патологом Фридрихом Нильсеном разработал метод окраски для идентификации кислотоустойчивых микобактерий [5].

Проницаемость клетки играет большую роль в феномене кислотоустойчивости микобактерий туберкулеза, поскольку вследствие особых свойств липопротеиновых комплексов, сосредоточенных на клеточной стенке, затрудняется реверсия краски из микробной клетки под воздействием кислоты. Для концентрации и организации кислотоустойчивого вещества, адсорбирующего краску, необходима целостность клеточной структуры. Полностью обезжиренные микобактерии туберкулеза не проявляют кислотоустойчивости. Установлено, что кислотоустойчивость микобактерий туберкулеза связана с липидными фракциями, однако большинство жиров и восков, входящих в состав липидов микобактерий туберкулеза, не способны удерживать краску после обработки кислотой. Кислотоустойчивость липидных фракций обуславливается наличием миколовой кислоты, одной из составляющих воска микобактерий туберкулеза. Термин миколовая кислота весьма условен, поскольку он лишь обобщает несколько индивидуальных миколовых кислот — длинноцепочечных разветвленных жирных кислот (C70–C80). Для сохранения кислотоустойчивости миколовая кислота должна иметь свободную гидроксильную группу, которая может быть эстерезирована. Микобактерии туберкулеза, ставшие не кислотоустойчивыми, могут опять приобрести это свойство, «одеваясь» в миколовую кислоту

или липополисахарид, в состав которого входит миколовая кислота [2].

Путем экстракции петролейным эфиром Bloch (1950) получил корд-фактор — соединение липида с миколовой кислотой. Это вещество, обычно находящееся на поверхности бактерий, обуславливает их склеивание и обеспечивает рост в виде «кос» или «тяжей» и является высокотоксичным для белых мышей. Корд-фактор у вирулентных бактерий находится в значительно большем количестве, чем у не вирулентных. Он окрашивается нейтральротом в красный цвет вследствие своей кислой реакции. Указанное является основой реакции Dubosu–Middlebrook (1948), при которой микобактерии туберкулеза окрашиваются в красный цвет, а большинство бактерий — в синий.

Нами рассмотрены некоторые методики окраски кислотоустойчивых бактерий (КУБ), которые широко используются в практике микробиологов, а также ранее предложенные методы окраски, но по разным причинам ограниченно применяющиеся в микробиологических лабораториях.

Для окраски препарата по методу Циля–Нильсена чаще всего применяют следующие растворы: 1 % карболовый фуксин, 3 % солянокислый спирт и 0,25 % метиленовый синий.

Фиксированный мазок на предметном стекле покрывают фильтровальной бумагой и на нее наливают 1 % раствор карболового фуксина с избытком («горкой»). Препарат держат пинцетом и нагревают над пламенем горелки до появления паров. Особенностью КУБ является невосприимчивость к красителям, поэтому для их окрашивания применяют подогретые концентрированные красители. Нельзя раствор доводить до кипения, поскольку температура свыше 70 °C быстро вызывает изменения клеточной стенки микробной клетки.

Подогретый мазок оставляют на 5 минут, чтобы краситель проник в клетку и окрасил ее. Затем пинцетом снимают и удаляют фильтровальную бумагу, осторожно смывают остатки краски, пока не прекратится видимое отхождение краски, и удаляют остаток воды, слегка наклонив каждое стекло.

Затем мазки заливают обесцвечивающим раствором 3 % солянокислого спирта на 3 минуты. Если препарат достаточно толстый, время обесцвечивания следует увели-

чить до того момента, пока от действия спирта не исчезнет окраска. Промывают мазки под слабой струей дистиллированной воды, поскольку обычная вода может содержать кислотоустойчивые сапрофиты, которые могут быть приняты за микобактерии.

Для получения контрастного изображения мазки заливают 0,25 % раствором метиленового синего на 1 минуту, после чего тщательно промывают водой и высушивают в вертикальном или наклонном положении.

При бактериоскопии выявлено, что в препарате, окрашенном по методу Циля–Нильсена, КУБ представлены тонкими, слегка изогнутыми, однако могут быть прямыми, извитыми, палочками ярко- или темно-розового цвета на синем фоне. Располагаются КУБ отдельно, парами или под углом друг к другу, нередко в виде римской цифры V, иногда в виде скоплений. КУБ можно также обнаружить внутри лейкоцитов, макрофагов, альвеолярных клеток. При лечении антимикобактериальными препаратами при микроскопии можно обнаружить морфологические изменения микобактерий: длинные, истонченные, короткие, толстые, разбухшие, кокковидные, мицелиеподобные, сегментированные. На концах, а иногда и в центре микобактерии могут иметь колбовидные утолщения, окрашенные более интенсивно, в результате чего КУБ становятся похожими на бусы. Иногда они состоят из отдельных зерен, а бледно-окрашенные участки могут проявлять себя как «полосы». Возможно также обнаружение их в виде диплококков бобовидной формы вне- и внутриклеточно [4, 6, 7].

Изучение морфологических особенностей КУБ в окрашенных по Цилю–Нильсену препаратах непременно должно сочетаться с определением жизнеспособности выделяемых микобактерий. Элиминация больными неживых микобактерий свидетельствует об эффективности лечения. Такой больной не представляет особой опасности для окружающих. Выделение же больным жизнеспособных микобактерий вызывает необходимость изоляции его как источника инфекции, а также пересмотра тактики лечения [8].

Для определения жизнеспособности микобактерий наиболее эффективен метод Мурахаши–Иосиды (Т. Murahashi, К. Yoshida) — окраска гистологических препаратов и нативных мазков малахитовым зеленым, карболо-

вым фуксином и основным коричневым, что позволяет обнаружить и различить по цвету живые и мертвые микобактерии. Фиксированный мазок мокроты, в которой обнаружены микобактерии при окраске по методу Циля–Нильсена, погружают в 1 % водный раствор малахитового зеленого на ацетатном буфере (рН 4,1) и выдерживают 7 минут при температуре 70 °С на водяной бане. Мазок охлаждают 3 минуты до комнатной температуры, ополаскивают водой и погружают в 5 % раствор карболового фуксина, разведенного дистиллированной водой *ex tempore* 1:8, выдерживают при комнатной температуре 5 минут. Затем ополаскивают водой и погружают на 2 минуты в специальный раствор, где происходит одновременное обесцвечивание и докрасивание, после чего препарат ополаскивают дистиллированной водой и высушивают. При микроскопии живые КУБ окрашены в ярко-зеленый цвет, мертвые — в красный.

Специальный раствор изготавливают по такой прописи: смешивают четыре объема 1 % основного коричневого с одним объемом 1 % раствора пикриновой кислоты, выдерживают в течение суток, фильтруют через бумажный фильтр и затем 30 мл фильтрата смешивают со 100 мл 2 % раствора азотной кислоты.

Для определения жизнеспособности микобактерий можно использовать и окрашенные по Цилю–Нильсену препараты, для чего их необходимо обесцветить 8 % раствором азотной кислоты, а затем окрасить указанным методом.

Иногда КУБ даже при правильной окраске выглядят очень бледными. Все это значительно усложняет дифференциацию КУБ, особенно если учесть, что другие микроорганизмы, не относящиеся к *M. tuberculosis*, тоже могут иметь различные формы — от длинных палочек до кокковидных форм с различной интенсивностью окрашивания (от ярко-красных до бледно-розовых), с различной степенью кислотоустойчивости.

В одной из модификаций метода окраски Циля–Нильсена в качестве основного красителя предлагается использовать насыщенный раствор генцианвиолета на анилиновой воде или раствор карболгенцианвиолета. Обесцвечивают такие препараты 25 % азотной кислотой, а при докрасивании применяют слабые растворы фуксина, сафранина или везувина (бисмаркбрауна). В этом случае туберкулез-

ные бациллы приобретают синий цвет, а ткань становится красной или бурой окраски.

В качестве замены методу Циля–Нильсена используют окрашивание по методу Киньена, так называемому методу холодного окрашивания [8–10].

Процедура окрашивания препаратов по методу Киньена идентична таковой по методу Циля–Нильсена, за исключением того, что в ходе исследования не подогревают карболовый фуксин. Как известно, все анилиновые красители, к которым принадлежит и фуксин, являются облигатными канцерогенами, особенно вредны их пары. Процедуры, связанные с появлением паров фуксина, являются крайне опасными для здоровья, их необходимо выполнять лишь в вытяжном шкафу. Использование метода холодного окрашивания и тех же реактивов, что и для метода Циля–Нильсена, занимает не намного больше времени, обеспечивает такие же результаты, при этом безопасно для работников лаборатории.

Способ окраски препаратов по Паппенгейму для выявления микобактерий по своей надежности и достоверности не уступает методу окраски по Цилю–Нильсену [6]. Фиксированные мазки в течение 2 минут, нагревая, красят 5 % раствором карболового фуксина. Затем, не промывая, погружают на 1 минуту в насыщенный раствор метиленовой синьки с кораллином, приготовленный следующим образом: 1 г кораллина разводят в 100 мл насыщенного спиртового раствора метиленовой синьки и добавляют 20 мл глицерина. Следует учесть, что одним из признаков микобактерий туберкулеза, отличающим их от других сапрофитов, является спирто- и кислотоустойчивость. Метод окрашивания по Паппенгейму не предусматривает применения кислоты, что может быть недостаточным для надежного дифференцирования патогенных микобактерий.

Метод Френкеля (Fränkelä–Gabeet) предполагает одновременное обесцвечивание и контрастное окрашивание. Мазок сперва окрашивают 5 % раствором карболового фуксина, нагревая над пламенем горелки в течение 2 минут. На обесцвечивание и докрашивание затрачивается всего 2 минуты. Эти этапы совмещают, используя следующую смесь: 50 мл 96 % спирта, 20 мл 15 % азотной кислоты, 30 мл дистиллированной воды.

Предварительно в этой же смеси растворяют до насыщения метиленовый синий или основной коричневый. После докраски мазок промывают, сушат и изучают под иммерсией [9]. Отмеченный метод окрашивания является достаточно быстрым, надежным и эффективным, т. е. таким, который целесообразно применять в практике в качестве дополнительного или альтернативного метода окрашивания биологического материала для выявления КУБ.

В качестве контрастного красителя возможно применение спиртового раствора йода — метод Кронбергера. Фиксированные мазки красят, как и при методе Циля–Нильсена, карболовым фуксином до образования паров. Затем обесцвечивают раствором 15 % азотной кислоты и промывают в растворе 60 % спирта. Контрастным красителем служит 4 % спиртовой раствор йода, разведенный 4-кратно 60 % этиловым спиртом. Докрашивание занимает 30 с. Окрашенный мазок необходимо хорошо промыть водой и высушить. В препарате, окрашенном по Кронбергеру, микобактерии туберкулеза красного цвета с темно-красными или черными зернышками, которые в свободном виде окрашены (зерна Much). Прочие бактерии и ткани остаются неокрашенными.

Как известно, для окраски бактерий используют главным образом анилиновые красители — генцианвиолет, метиленовую синь, фуксин, а также очень близкий последнему по составу рубин, везувин (бисмаркбраун) и др. Кроме бактерий эти краски интенсивно и прочно окрашивают ядра эукариотических клеток, другие элементы тканей окрашиваются менее интенсивно. Следует помнить, что растворы метиленовой синьки не переносят сильного нагревания, а уже окрашенные метиленовой синькой препараты со временем выцветают. Для окраски тканей в отличный от бактерий цвет используют, кроме основных, кислые анилиновые красители, например, озонин и кармин [10].

Усиленные растворы анилиновых красок нативные препараты окрашивают интенсивнее, чем простые. Раствор метиленовой синьки по Леффлеру, карболовый фуксин Циля–Нильсена, карболгенцианвиолет, карболглицериновый фуксин по Szaplewski, карболовая метиленовая синька по Kuhne, карболовый тионин по Nikolle, метиленовая синька

с бурой по Manson, красящие растворы на анилиновой воде — далеко не полный их перечень. Окрашивающая способность растворов может быть повышена добавлением 1 мл 1 % раствора NaOH к 100 мл краски. Лучше всего в каждом конкретном случае готовить и использовать свежие растворы красителей.

Окрашивание КУБ флюорохромными красителями применяется в основном в тех лабораториях, которые обеспечены оборудованием для проведения люминесцентной микроскопии.

Метод флюоресцентного окрашивания предназначен для быстрого окрашивания большого количества проб. Люминесцентная микроскопия является ускоренным методом, поскольку проводится при более низком увеличении, чем обычная световая бактериоскопия, и за один и тот же период времени может быть просмотрено больше полей зрения исследуемых проб. Флюорохромное окрашивание считается более чувствительным методом, чем метод окрашивания по Цилю–Нильсену. Однако для достоверности результатов следует проводить повторное окрашивание положительных флюорохромных мазков любым методом окрашивания с использованием карболового фуксина, поскольку структура КУБ с трудом выявляется при флюорохромном окрашивании [11]. Кроме того, анализ окрашенных препаратов желательно проводить в тот же день из-за нестабильности флюорохромного красителя, хотя и допускается хранение мазков в холодильнике до 12 часов.

Микроскопия мазка мокроты — наиболее доступный и достаточно эффективный метод выявления источников туберкулезной инфекции. Этот метод чаще всего используется для диагностики заболевания у лиц с подозрением на легочную патологию, а также для установления источников инфекции у лиц с жалобами на кашель, обратившихся в лечебные учреждения по самым различным поводам. Микроскопию мокроты используют также для оценки патологических изменений в процессе лечения и в целях контроля его эффективности [11].

Качество окраски элементов клеточных структур зависит от ряда факторов. Известно, что препараты, окрашенные люминесцентными красителями, при хранении от 6 часов и

до нескольких суток в большинстве случаев легко теряют мелкие структурные компоненты, при неправильном длительном хранении растворов красители выпадают в осадок, изменяют свою химическую структуру. Загрязнение образца пробы нативного материала нормальной микробной флорой, кровью или отдельными компонентами красителей приводит к существенному нарушению процесса окрашивания в целом и уже этим снижает достоверность исследования. На окрашивание и оттенок расцветки существенное влияние оказывает рН, при этом безразлично, каким способом добавляют рН-ионы, важной является лишь их концентрация.

На качество окрашивания непосредственно влияют тип и состав красителя; концентрация краски не всегда определяет окрашивающую способность. Качество расцветки связано также с длительностью действия красителя, срока изготовления и пригодности реактива. Не стоит забывать и то, что раствор карболового фуксина необходимо фильтровать перед использованием, поскольку он трудно растворяется и формирует грубые кристаллы, что существенно усложняет процедуру бактериоскопии.

При контрастном окрашивании фона препарата раствором метиленового синего следует помнить, что этот краситель способен как бы «скрывать» КУБ. Чаще всего указанное случается при превышении времени окрашивания или при очень толстом слое биоматериала на предметном стекле.

В случае выявления измененных форм КУБ следует проверять качество красителей, кроме того, положительный ответ должен быть подтвержден дополнительными методами исследований.

Чтобы уберечь себя от неудач, желательно употреблять краски лишь известных фирм и фабрик, серьезное внимание следует обращать на точное название краски. Кроме того, необходимо соблюдать условия хранения красителей, которые рекомендуются производителем, а также учитывать сроки пригодности реактивов [12].

Получение достоверных результатов также в значительной мере зависит от квалификации сотрудников и оснащения лаборатории. Персонал должен быть должным образом подготовленным, обязательно необходимо контролировать четкость и качество

процедур приготування, окрашивания и микроскопии мазков мокроты.

Метод окраски КУБ по Цилю–Нильсену широко распространен. Такое весьма простое окрашивание препаратов биоматериала, содержащего микобактерии туберкулеза, имеет большое практическое значение. Однако существуют и другие, не менее эффективные, способы и методики окраски КУБ [6, 10]. Для

выявления КУБ можно уверенно применять и метод холодного окрашивания. Он такой же надежный, как и метод Циля–Нильсена, кроме того, является химически более безопасным для сотрудников лаборатории. Кроме того, в качестве альтернативного можно использовать метод окрашивания по Fränkelä–Gabeet, который удачно совмещает процедуры обезвечивания и контрастного докрасивания.

Список литературы

1. Красильников Н. А. Бактерии и актиномицеты / Н. А. Красильников // Жизнь растений : в 6 т. / под ред. А. Л. Тахтаджяна. — М. : Просвещение, 1980. — Т. 1. — С. 288–300; рис. 96–110.
2. Дрabbкина Р. Микробиология туберкулеза / Р. Дрabbкина. — М. : Гос. изд-во мед. лит-ры, 1963. — С. 25–26, 88–89.
3. Фтизиатрия / [за заг. ред. акад. А. Я. Циганенка і проф. С. І. Зайцевої]. — Харків : Факт, 2004. — С. 6–24, 40–46, 356–362.
4. Сакун Т. Лабораторна діагностика туберкульозу в клініко-діагностичних лабораторіях методом мікроскопії : навчальний посібник для медичних працівників лікувально-профілактичних установ загальної лікувальної мережі / Т. Сакун, І. Заїка, К. Кіскініс. — ВООЗ, 2006. — С. 9–11.
5. Скороходов Л. Я. Как развивалась микробиология / Л. Я. Скороходов. — М. : Медицина, 1965. — С. 40–43.
6. Выявления заразных форм туберкулеза легень в лікувальних закладах загальномедичної мережі : посібник для лікарів. — К., 2002. — 18 с.
7. Лабораторна діагностика туберкульозу та контроль за якістю бактеріоскопічних досліджень / [Ліпкан Г. М., М'ясніков В. Г., Скакун Т. Л. та ін.]. — К. : Медицина, 2006. — С. 15–30.
8. Методические рекомендации по контролю качества лабораторной диагностики туберкулеза методом прямой микроскопии мазка мокроты, окрашенного по Цилю–Нильсену. — Донецк, 2004. — С. 14–16.
9. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / [под ред. М. О. Биргера]. — М. : Медицина, 1982. — 24 с.
10. Абель Р. Бактериология. Краткое руководство для практических занятий в лаборатории / Р. Абель. — [8-е изд.]. — Харьков : Гос. изд-во Украины, 1923. — С. 58–61, 79–86.
11. Туберкулез: выявление, лечение и мониторинг по К. Томену. Вопросы и ответы / пер. с англ. ; под. ред. Т. Фридена. — [2-е изд.]. — Женева, 2004. — С. 3–4, 8.
12. Феценко Ю. І. Менеджмент у фтизіатрії / Ю. І. Феценко, В. М. Мельник, А. В. Лірник. — К. : Здоров'я, 2007. — 680 с.

Г.О. Ковальова

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА МЕТОДІВ ЗАБАРВЛЮВАННЯ МІКОБАКТЕРІЙ І ПЕРСПЕКТИВА ВДОСКОНАЛЕННЯ МІКРОСКОПІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Наведено відомості про склад, будову і відмінні структурні елементи мікробної клітини мікобактерій, подано різні способи забарвлювання кислотостійких бактерій, розглянуто особливості, на які слід звертати увагу, щоб уникнути помилок при проведенні бактеріоскопічного дослідження.

Ключові слова: мікобактерії туберкульозу, міколові кислоти, карболовий фуксин.

G.O. Kovalyova

COMPARATIVE ESTIMATION OF COLOURING OF MYCOBACTERIUM AND PROSPECT OF IMPROVEMENT MICROSCOPIC DIAGNOSTICS TUBERCULOSIS

The information about the composition, structure and distinctive structural elements of the microbial cells of *Mycobacterium* are provided, different ways of colouring acid-fast bacteria are presented, features of that need to pay attention to prevent errors during the lead through bacterioscopic research are discussed.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, mycolic acids, carbolic magenta.

Поступила 03.04.12