

УДК 504.055(043.5)

©Г. О. Ковальова

Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України

ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАГАЛЬНОПРИЙНЯТИХ МЕТОДІВ ЗАБАРВЛЕННЯ КИСЛОТОСТІЙКИХ БАКТЕРІЙ

ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАГАЛЬНОПРИЙНЯТИХ МЕТОДІВ ЗАБАРВЛЕННЯ КИСЛОТОСТІЙКИХ БАКТЕРІЙ – з метою пошуку оптимальних та надійних способів фарбування кислототривких бактерій у мазках біологічного матеріалу проведено дослідження і порівняння якості та надійності різних відомих методик фарбування. Доведено, що забарвлення за методом Циля–Арманда, Кіньона та Франкеля–Габбет дозволяє швидко отримати достовірні результати та може виступати в якості альтернативи методу Циля–Нільсена. Кисле середовище сприяє кращому зв'язуванню барвника зі структурними клітинами.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОБЩЕПРИНЯТЫХ МЕТОДОВ ОКРАСКИ КИСЛОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ – с целью поиска оптимальных и надежных способов окрашивания кислотоустойчивых бактерий в мазках биологического материала проведено исследование и сравнение качества и надежности разных известных методик окраски. Доказано, что окрашивание по методу Циля–Арманда, Киньона и Франкеля–Габбет позволяет быстро получить достоверные результаты и может выступать в качестве альтернативы метода Циля–Нильсена. Кислая среда способствует лучшему связыванию красителя со структурами клетки.

EFFICIENCY OF THE GENERALLY ACCEPTED METHODS OF COLOURING OF ACID-FAST BACTERIA – With the purpose of research of optimum and reliable methods of colouring of acid fast bacteria in smears of biological material and comparison of quality and reliability of the different known methods of colouring were conducted. It is proved that the colouring by the Ziehl-Armand, Kin'on and Frankel-Habbet methods allows quickly to get reliable results and can serve as an alternative of Ziehl-Neelsen method. Acidic environment is instrumental in the best binding of dye to the structures of cage cell.

Ключові слова: кислотостійкі бактерії, карболовий фуксин, методи фарбування.

Ключевые слова: кислотоустойчивые бактерии, карболовый фуксин, методы окраски.

Key words: acid-fast bacteria, carbolfuchsin, methods of colouring.

ВСТУП На сьогодні в усьому світі для виявлення кислотостійких бактерій (КСБ) найбільш поширеним є метод забарвлення за Цилем–Нільсеном (Ziehl, Neelsen). З часу відкриття мікобактерій вже було відомо, що вони не забарвлюються звичайними спиртово-водними розчинами анілінових фарб. Для стійкого забарвлення мікобактерій фарба повинна містити в собі протраву, яка б заздалегідь підготувала клітинну стінку мікроба для сприйняття фарби [1]. Р. Кох, а згодом і Ерліх застосовували в якості протравляючої речовини анілін, та стабільності результатів досягти не вдалось, оскільки ця сполука досить нестійка. У 1882 р. Циль запропонував замість аніліну використовувати карболову кислоту, яка виявилась вельми придатною для цієї мети. Циль застосував для забарвлення мікобацил 2 % розчин метилвіолету в насиченому водному розчині карболової кислоти. У цьому розчині препарат фарбували 1 год, після чого його промивали водою і знебарвлювали в азотній кислоті. У 1884 р. Нільсен спростив і значно прискорив забарв-

лення, залишивши від способу Циля лише ідею застосування карболової кислоти. Замість запропонованого Цилем метилвіолету Нільсен використав розчин наступного складу: фуксин основний – 1 г; 5 % карболова кислота – 100 мл; спирт 96 % – 10 мл. Для прискорення фарбування біопрепарат підігрівав у розчині фарби до появи пари. Гістологічні зрізи фарбували 10–15 хв при кімнатній температурі. Після забарвлення фуксином препарат знебарвлювали 25 % сірчаною кислотою, промивали водою і дофарбовували водним розчином метиленового синього 1–2 хв. Цей спосіб фарбування мікобактерій став класичним і отримав назву способу Циля–Нільсена [2].

З часом було запропоновано цілу низку корисних модифікацій вказаного способу, наприклад, перед змішуванням спирту і карболового розчину розтирати фуксин з декількома краплями гліцерину. Для того, щоб при забарвленні можна було переконатися, що виявлена паличка не лише кислотостійка, але і спиртоустійка – ознака, необхідна для туберкульозно-палички, Гунтер для знебарвлення використав не водний розчин кислоти, а 3 % солянокислий алкоголь. Габбет (Gabbet) для прискорення забарвлення запропонував знебарвлення і додаткове фарбування об'єднати в один акт [3, 4].

У даний час для забарвлення за Цилем–Нільсеном рекомендують використовувати 0,3 % розчин карболового фуксину, один знебарвлювальний розчин на вибір – 3 % спиртовий розчин соляної кислоти або 25 % розчин сірчаної кислоти, для дофарбовування – 0,3 % водний розчин хлориду метиленового синього [5, 6].

Таке забарвлення дуже наглядне за яскравістю і контрастністю з фоном – червона туберкульозна паличка на синьому тлі. Поєднання кольорів приємне і зручне для очей. Проте інколи КСБ навіть при правильному забарвленні виглядають блідими, що пов'язано із структурними змінами мікробно клітини в процесі хіміотерапії [1, 7]. Вказане значно ускладнює диференціацію КСБ, особливо якщо врахувати, що інші мікроорганізми (тобто не *M. tuberculosis*) теж можуть мати різну морфологію – від довгих паличок до коккоподібних форм із різною інтенсивністю фарбування (від яскраво-червоних до блідо-рожевих), з різною мірою кислотостійкості.

У методах, запропонованих згодом для забарвлення мікобактерій, змінювалися протрави, знебарвлювальні речовини, але карболовий фуксин використовували у більшості модифікацій [8].

Метою роботи стало означити ефективність і надійність методів фарбування мікобактерій туберкульозу; провести порівняння забарвлення за методами Кіньона, Циля–Арманда, Паппенгейма, Франкеля–Габбет з методом Циля–Нільсена, визначити дію різних чинників на якість фарбування.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Для дослідження відібрано 64 позитивних зразки мокротиння від 28 хворих

бактеріовиділювачів, які знаходилися на стаціонарно-лікуванні.

З кожного зразка матеріалу було виготовлено по 6 мазків для кожного методу фарбування (1920 мазків). Кожен мазок готували відповідно до стандарту – мокротиння наносили стерильною дерев'яною паличкою на ділянку 1x2 см на знежирене предметне скло. Сушили мазки у витяжній шафі без додаткового підігрівання, фіксували шляхом нагрівання протягом 2 год при температурі 75 °C у пічці типу драй-блок DBMS-40 фірми "BioSan", Латвія.

В якості контролю були слайди, фарбовані за методом Циля-Нільсена, відповідно до Інструкції з мікробіологічно діагностики туберкульозу від 06.02.2002 р. На мазок наносили 1 % розчин профільтованого карболового фуксину, підігрівали до появи пари і залишали на 5 хв, потім знебарвлювали 3 % солянокислим спиртом протягом 3 хв і дофарбовували 0,25 % розчином метиленового синього 1 хв.

Другу серію мазків фарбували за методом Кіньона 1 % карболовим фуксином 15 хв без нагрівання, знебарвлювали розчином солянокислого спирту 3 хв і дофарбовували 1 хв 0,3 % розчином метиленового синього.

Третю серію мазків фарбували за Паппенгеймом 1 % розчином карболового фуксину 2 хв, підігрівали до появи парів, знебарвлювали і дофарбовували одразу 1% спиртовим розчином метиленового синього з кораліном протягом 2 хв.

Розчин кораліну готували за наступним прописом: коралін – 1,0; гліцерин – 20,0; 1 % розчин метиленово синьки в 96 % етанолі 100,0.

Четверту серію мазків фарбували 5 хв карболовим фуксином, промивали водою, знебарвлювали і дофарбовували реактивом "Арманда" в один етап протягом 2 хв.

П'яту серію мазків було пофарбовано за методом Френкеля-Габбет 1 % карболовим фуксином 5 хв, фарбу підігрівали до появи парів, знебарвлювали і дофарбовували в один етап протягом 2 хв розчином 1 % метиленового синього у знебарвлювальній суміші. Знебарвлювальну суміш готували за наступним прописом: 50 мл 96 % спирту, 20 мл 15 % розчину азотної кислоти, 30 мл дистильованої води.

Бактеріоскопічне дослідження проводили зі збільшенням x1000 за допомогою імерсійного об'єктива бінокулярного мікроскопа "Olympus CX-21", Японія.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА Х ОБГОВОРЕННЯ Якість забарвлення елементів клітинних структур залежить від цілого ряду чинників. Так, забруднення зразка проби нативного матеріалу нормальною мікробною флорою, кров'ю або окремими компонентами фарб, приводить до істотного порушення процесу фарбування в цілому і вже цим суттєво знижує достовірність дослідження.

При контрастному фарбуванні фону препарату розчином метиленового синього цей фарбник здатний якби "приховувати" кислотостійкі мікобактерії. Найчастіше вказане трапляється при перевищенні часу фарбування або при дуже товстому шарі біоматеріалу на предметному склі.

При бактеріоскопічному дослідженні контрольних мазків (384 слайди), пофарбованих за Цилем-Нільсе-

ном, в усіх зразках було виявлено КСБ, представлені тонкими, дещо вигнутими паличками яскраво-червоного кольору на синьому тлі, розташовані окремо, іноді скупченнями. Мазки оцінено як позитивні на 1+, 2+, 3+.

У мазках, пофарбованих за Кіньоном і Цилем-Армандом, результати виявились ідентичними контролю. Слайди визначено як позитивні (1+, 2+, 3+), КСБ мали насичений рожевий колір, добре контрастували з блакитним фоном.

В усіх дослідах основним барвником виступав карболовий фуксин. Як відомо, усі анілінові барвники, до яких належить і фуксин, є облігатними канцерогенами, особливо шкідливі в пари. Процедури, пов'язані з появою парів фуксину, є вкрай несприятливими для здоров'я, х необхідно виконувати лише у витяжній шафі. Використання методу холодного фарбування з використанням тих самих реактивів, що і для методу Циля-Нільсена, займає трохи більше часу, проте забезпечує такі самі результати і є більш безпечним для працівників лабораторії. Метод холодного фарбування з використанням розчину Арманда дозволяє протягом 7 хв отримати результат, не вимагає підігрівання предметного скла, дає чітке контрастування і високу відтворюваність результатів.

При фарбуванні за Паппенгеймом звертає увагу швидкість отримання результатів – за 5 хв маємо пофарбований мазок. Але при бактеріоскопі виникають деякі складнощі. Так, 234 (61 %) зразків виявились недостатньо знебарвленими – КСБ мали темно-коричневий колір на брудно-синьому, місцями бурому фоні лейкоцитів, волокон, клітин епітелію тощо. 96 % розчин етанолу за короткий час не забезпечував належного знебарвлення ні мікобактерій, ні інших елементів мокротиння. Нашарування метиленового синього на залишки фуксину ускладнило виявлення КСБ. Враховуючи, що однією з ознак мікобактерій туберкульозу, на відміну х від інших сапрофітів, є спирто- і кислотостійкість, а метод фарбування за Паппенгеймом не передбачає використання кислоти. За цим методом не вдається перевірити кислототривкість виявлених мікроорганізмів. Хоча в нашому досліді усі зразки було оцінено як позитивні, при застосуванні цього методу в практиці отримані результати можуть бути недостовірні та вимагають додатково перевірки.

Фарбування мазків за методом Франкеля-Габбет займає лише 10 хв. Проте забарвлення фону в 261 (68 %) мазках мало бліде блакитне забарвлення. Слабке утримання контрастного барвника можна спробувати пояснити його недостатньою концентрацією, дією кислоти, малою тривалістю часу дофарбування. Дослід було проведено повторно. При цьому взято 2 розчини метиленового синього в знебарвлювальній суміші – 3 % і 1 % розчини, в яких витримували біопрепарати відповідно 2 і 7 хв. У першій серії забарвлення фону виявилось чітким і контрастним у 146 мазках із 192 (76 %), в 46 мазках фон залишився блідий. У другій серії в 171 мазках із 192 (89 %) було отримано якісне забарвлення фону.

Тим не менш, усі зразки, пофарбовані за методом Франкеля-Габбет, було оцінено за позитивні (1+, 2+, 3+), КСБ мали вигляд тонких паличок яскраво-рожевого кольору на блакитному фоні. Зазначений метод фарбування у досліді виявився швидким,

надійним і ефективним, тобто таким, який доцільно застосовувати в практиці у якості додаткового або альтернативного методу фарбування біологічного матеріалу для виявлення КСБ.

ВИСНОВКИ Проведені досліді підтвердили, що на якість фарбування безпосередньо впливають тип і склад барвника; концентрація фарби не завжди визначає фарбувальну здатність. Якість забарвлення пов'язана також із тривалістю дії барвника, терміну виготовлення і придатності реактиву. В нашому дослідженні використано свіжі, сертифіковані барвники і при мікроскопічному дослідженні не виявлено суттєвих розбіжностей між препаратами, забарвленими слабкою фарбою тривалий час і тими, що були забарвлені короткий час концентрованим розчином барвника. За даними літературних джерел усі запропоновані до цих пір варіанти забарвлення не мають істотних переваг перед методом Циля–Нільсена. Результатами нашого дослідження доведено, що для виявлення КСБ можна впевнено застосовувати і метод холодного фарбування. Він так само надійний, як і метод Циля–Нільсена, крім того є хімічно безпечнішим. Крім того, як альтернативний, можна використовувати фарбування за методом Франкеля–Габбет, який вдало поєднує процедури знебарвлення і дофарбування.

Відомо, що препарати з терміном зберігання від 6 год і до декількох діб давності в більшості втрачають дрібні структурні компоненти, випадають в осад, змінюють свою хімічну структуру. Не варто забувати і те, що розчин карболового фуксину необхідно фільтрувати перед використанням, оскільки він важко розчиняється і формує грубі кристали, що суттєво ускладнює процедуру бактеріоскопі. У разі виявлення змінених форм кислототривких бактерій слід перевіряти якість барвників, крім того позитивна відповідь має бути підтверджена додатковими методами досліджень.

На фарбування і відтінок забарвлення істотно впливає рН, при цьому байдуже яким способом додають рН-іони, важлива лише їх концентрація. У нашому дослідженні в кислому середовищі барвники сприй-

малися краще, отримане забарвлення було насичене та чітке. В лужному середовищі ті ж самі розчини барвників трималися гірше, при бактеріоскопі мазки виявились млявими, погано контрастували.

Аби уберегти себе від невдач, бажано застосовувати фарби лише відомих фірм і фабрик, серйозну увагу необхідно звертати на точну назву фарби. Крім того, вельми доцільно дотримуватись умов зберігання і термінів придатності реактивів, що рекомендують.

Отримання достовірних результатів значною мірою залежить від кваліфікації співробітників лабораторії. Персонал має бути належним чином підготовленим, його роботу необхідно контролювати, аби приготування, фарбування і вивчення мазків мокротиння на наявність кислототривких мікобактерій проводилося чітко і надійно. Якісний контроль за цією роботою є обов'язковим.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Микробиология туберкулеза / Р. Дабкина. – М. : Государственное издательство медицинской литературы, 1963. – С. 25–26, 88–89.
2. Авербух Л. Г. Туберкулез: этапы борьбы, обретения и потери / Л. Г. Авербух. – Одесса. : Оптимум, 2005. – С. 45–138.
3. Jrundriss der Bacteriologie fur aeryte und studierende von проф. S.L. Srhenk. Вена, Лейпциг, 1893. – С. 46–64.
4. Die Methoden der Bakterien – Forschung. – проф. Ferdinand Hueppe. Wierbaden, 1885
5. Наказ МОЗ Укра ни від 06.02.2002 р. №45 Інструкція з бактеріологічно діагностики туберкульозно інфекції.
6. Сакун Т. Лабораторна діагностика туберкульозу в клініко-діагностичних лабораторіях методом мікроскопі : навчальний посібник для медичних працівників лікувально-профілактичних установ загально лікувально мережі / Т. Сакун, І. За ка, К. Міскініс. – ВООЗ, 2006. С. 9–11
7. Абель Р. Бактериология: краткое руководство для практических занятий в лаборатории. 8-е издание / Абель Р. – Харьков, Государственное издательство Украины, 1923. С. 58–61, 79–86.
8. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред. М. О. Биргера / М. : Медицина, 1982. – С. 24.

Отримано 13.10.11