

Г.О. Ковальова

## ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ У ФІКСОВАНИХ І ФАРБОВАНИХ ЗА ЗАГАЛЬНОПРИЙНЯТИМИ МЕТОДАМИ МАЗКАХ МОКРОТИННЯ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова» НАМН України»

Для дослідження життєздатності мікобактерій у мазках мокротиння після фіксації і фарбування за Цилем-Нільсенем застосовано метод мікрокультивування на предметному склі. Фіксація біологічного матеріалу при 75 °С протягом 1,5 год та в пофарбованих препаратах надійно знезаражує об'єкт. Після фіксації в полум'ї пальника в усіх мазках протягом 7 днів мікобактерії туберкульозу залишилися живими. Життєздатні мікобактерії можуть являти небезпеку для лабораторного персоналу.

**Ключові слова:** фіксація, мікобактерії, мазки мокротиння, культивування на склі.

Незважаючи на новітні досягнення в бактеріології мікобактеріозів, за основу діагностики туберкульозу та контролю за лікуванням цієї хвороби в усьому світі прийнято бактеріоскопічне дослідження мазка мокротиння для виявлення кислотостійких бактерій. Цей простий, недорогий, загальнодоступний, швидкий, досить чутливий метод дає змогу виявити заразних хворих в різні періоди напруження патологічного процесу. Найефективнішою профілактикою туберкульозу є швидка діагностика та ізоляція бактеріовиділювачів для подальшого лікування, особливо стосовно пацієнтів з легеневою формою хвороби.

Для контролю якості діагностування за цим методом на етапі фарбування використовують позитивні та негативні фіксовані незабарвлені мазки.

У мікробіологічній практиці широко застосовується метод фіксації біологічних препаратів (мазків на предметному склі) шляхом термічної обробки (фіксація жаром – *heat fixing*).

Мета фіксації:

1. Закріплення мікроорганізмів і біоматеріалу в цілому на певній ділянці предметного скла.
2. Знешкодження біоматеріалу.

3. Набування стану, в якому біоматеріал проявляє стійкість до подальшого впливу різних хімічних речовин.

4. Поліпшення сприйняття біоматеріалом барвників.

Більшість джерел літератури вже більше ста років рекомендує для досліджень препарати, фарбовані за Грамом, Циль-Нільсенем, Хагеманном і іншими методами після термічної фіксації біологічного матеріалу. Вважають за раціональне проводити фіксацію в полум'ї спиртівки або газового пальника. Проте параметри цієї процедури в різних керівництвах з мікроскопічної техніки наводяться досить невизначено: швидко проводити тричі над полум'ям, так аби мазок прогрівався до 70-80 °С протягом 3-4 с тощо. В інших джерелах тривалість теплової обробки варіює від 2 до 10 с. Не зазначається чітко, чи це має бути сумарна експозиція, чи тривалість одного проведення скла через полум'я; не конкретизується, в якій частині полум'я проводити обробку, якої товщини скло рекомендується і таке інше. Найбільш поширеною рекомендацією щодо контролю температурної обробки препарату, наприклад, є: прикладання до тильної поверхні кисті вільної від мазка частини предметного скла. При так званій «правильній» фіксації скло має бути гарячим, але не викликати відчуття опіку (70-80 °С). Тобто, начебто все всім зрозуміло, та кожний робить по-своєму, але ж всі впевнені в надійності методу.

Основоположники різних методів забарвлення і фіксації біологічних мікроскопічних препаратів рекомендували використовувати фіксацію на підігрітих пластинках міді (П. Ерліх, 1832 р.).

М.Н. Никифоров (1885 р.) рекомендував використання нагріву в «особливій шафі при температурі 100-120-130 °С протягом відомого часу, залежно від того, в якому напрямі бажають провести дослідження».

У методичних рекомендаціях по контролю якості лабораторної діагностики туберкульозу методом прямої мікроскопії мазка мокроти, забарвленого за Цилям-Нільсеном [1], рекомендують фіксувати мазки таким чином: скельця сухим мазком догори за допомогою пінцета повільно провести через верхню третину полум'я пальника 2-3 рази по 2-3 секунди. З метою дотримання безпеки персоналу та при великих обсягах роботи оптимальним є метод фіксації по А. Найн: предметні скельця з мазками розкладають на металеві або емальовані лотки і поміщають в сушильну шафу, в якій їх спочатку висушують при 37 °С, у подальшому температуру підвищують до 105 °С і через 10 хв шафу вимикають [1]. При такому підступі досягаються надійне прикріплення мазка до скла і загибель мікобактерій, що знаходяться в матеріалі мазка, а також тих, що випадково попали на лоток. Фіксуюча температура не повинна перевищувати 105 °С, аби не змінити тинкторіальні властивості мікобактерій.

Згідно з інструкцією з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції [2], біопрепарати слід фіксувати, використовуючи один із способів: провести скельце (мазком догори) через полум'я 3-4 рази або на спеціальній нагрівальній платформі при 65-75 °С протягом 2 год.

У ряді досліджень [3-5] показано, що фіксація в полум'ї все ж таки не виконує одне з основних завдань: мікобактерії туберкульозу не гинуть у фіксованих мазках мокротиння. Крім того, фіксація в полум'ї може призводити до появи на мікропрепараті додаткового фону з продуктів горіння, що погано змивається [6].

Будь-який мазок патологічного матеріалу може бути потенційним фактором передачі для співробітників лабораторії (Smithwick, 1976). Хоча мікобактерії гинуть при фарбуванні мазків за методом Циля-Нільсена, залишається до сьогодні неясним, скільки ж часу бацили можуть проявляти життєздатність у фіксованих мазках до фарбування.

### Матеріали і методи

Досліджено 28 зразків мокротиння від хворих на туберкульоз легень, бактеріовиділювачів, що знаходились на стаціонарному лікуванні. З кожного зразка мокротиння виготовлено 3 препарати для відповідного дослідження – 10 серій мазків по 3 препарати.

Перша серія не нагрівалась і являла собою контроль. З мазками другої, третьої, четвертої, п'ятої та шостої груп було проведено термічну фіксацію у полум'ї – скельце брали пінцетом так, щоб мазок розташову-

вався зверху, проводили 2-3 рази через верхню частину полум'я пальника.

В сьомому, восьмому та дев'ятому дослідах зразки фіксовано шляхом нагрівання при 75 °С у пічці типу драй-блок DBMS-40 фірми "BioSan", Латвія, час фіксації становив 30 хв, одну та півтори години відповідно.

Десяту серію мазків фіксовано в полум'ї пальника та пофарбовано за методом Циля-Нільсена.

Для виявлення живих мікобактерій туберкульозу в мазках мокротиння після термічної фіксації було використано метод культивування мікобактерій на предметних скельцях. Зразки культивували у середовищі з кров'ю. 3-тю, 4-ту, 5-ту і 6-ту серії мазків культивували відповідно через 24, 48, 72 год і 7 діб після фіксації.

Життєздатність мікобактерій в пофарбованих мазках досліджувалась в такий саме спосіб.

Досліджуваний матеріал обробляли 0,5 % розчином N-ацетил-L-цистеїну з 1 % розчином гідроксиду натрію протягом 15 хв при кімнатній температурі, центрифугували 15 хв швидкості 3000 g, температурі +15 °С. З осаду готували мазки на стерильних вузьких скельцях, які було отримано шляхом розрізання предметного скла вздовж на 2 частини. Мазки готувались на 1/3 частині скельця, яке укладалось в стерильну чашку Петрі. Сушка мазків проводилась у витяжній шафі без додаткового підігрівання.

Для отримання культури використовувалось кров'яне середовище, рекомендоване наказом МОЗ України №45 від 06.02.2002 р. Контрольні мазки спочатку заливали 3 % розчином сірчаної кислоти на 2 хв для фіксації, потім тричі відмивали стерильною водою. Контрольні й дослідні зразки культивували шляхом занурення кожного скла у хімічні пробірки (16×150 мм), які містили 8 мл поживного середовища (цитратна гемолізована кров). Облік результатів проводився через 10 діб інкубації в термостаті при температурі 37 °С.

Цитратну кров гемолізували стерильною дистильованою водою в співвідношенні 1:5. Використовувалась донорська кров, вже непридатна для переливання.

З метою пригнічення супутньої флори до середовища було додано поліміксин Б (200 ОД/мл), триметоприм (10 мг/л), карбеніцилін (100 мг/л) та амфотерицин В (10 мг/л).

Після інкубації скельця було видалено із середовища, промито дистильованою водою і незаражено 5 % розчином гіпохлориту натрію протягом 10 хв. Пробірки із середовищем було проавтоклавовано, мазки підсушено та пофарбовано за методом Циля-Нільсена. Проводилась мікроскопія при збільшенні ×10, окуляр ×10. Мікроскопію проводили за допомогою біокулярного мікроскопа Olympus CX-21, Японія. При знаходженні в мазках характерних мікроколоній, забарвлених в чер-

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

воний колір, переплетених джгутів, так званих "кіс", результат оцінювався за позитивний.

Дані додаткового бактеріологічного дослідження.

Всі зразки мокротиння з метою деконтамінації і гомогенізації було оброблено 4 % розчином гідроксиду натрія протягом 20 хв при температурі 20 °С. Проведено засів на середовища Левенштейна-Йенсена та Фінна-2, інкубовано в термостаті при 37 °С протягом 8 тижнів. Культури ідентифіковано як мікобактерії туберкульозу за наступними тестами: швидкість росту, пігментоутворення, продукція ніацину, відновлення нітратів, каталазна активність, термостабільність каталази (при 68 °С, рН 7,0), здатність росту на середовищі з паранітробензойною кислотою (500 мг/мл).

### Результати досліджень та їх обговорення

В першому досліді всіх 84 контрольних зразків (висушених, але не фіксованих термічно), а також першої серії мазків, які було фіксовано у полум'ї

пальника і одразу культивовано, виявлено ознаки росту – при культивуванні на склі в середовищі з кров'ю відбулось формування корд-фактору мікроколоній.

Близько 9,50 % (n=8) бактерій залишаються живими в мазках одразу після фіксації у полум'ї пальника. Протягом двох діб залишаються живими мікобактерії у 7,14 % (n=6) випадків. Недостатньо надійно фіксовані бактерії проявили життєздатність протягом трьох діб у 4,76 % (n=4) зразків. В 2,38 % (n=2) фіксованих в полум'ї пальника позитивних мазків мокротиння мікобактерії туберкульозу вижили протягом семи діб (табл. 1).

При використанні для фіксації методу нагрівання при температурі 75 °С триваліше однієї години (1,5 години) ознак росту при культивуванні мазків не виявлено. При фіксації в такий спосіб протягом 1 години та 30 хвилин позитивний результат було отримано відповідно в 1 (1,19 %) і 3 (3,57 %) зразках.

Таблиця 1

Життєздатність мікобактерій у мазках, фіксованих в полум'ї пальника, шляхом нагрівання при температурі 75 °С, та у мазках, фарбованих за методом Циля-Нільсена (Ц-Н)

	Контрольна серія	Час після фіксації в полум'ї пальника					Час фіксації нагріванням при температурі 75 °С			Ц-Н
		0 год	24 год	48 год	72 год	7 діб	30 хв	1 год	1,5 год	
Кількість досліджених мазків	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84
Кількість позитивних проб, абс	84	8	6	6	4	2	3	1	0	0
Відсоток позитивних проб	100,0	9,50	7,14	7,14	4,76	2,38	3,57	1,19	0	0

В жодному з пофарбованих за Цилем-Нільсеном мазків мокротиння ознак росту при культивуванні означено не було.

Як і очікувалось, результати досліді довели, що мікобактерії не виживають в препаратах, пофарбованих за Цилем-Нільсеном. Це може бути пов'язано з тим, що клітини мікобактерій руйнуються фенолом, який входить до складу барвника фуксину.

Дослідження показало, що фіксація в полум'ї пальника може бути недостатньо надійною, мікобактерії туберкульозу можуть проявляти життєздатність протягом 7 діб та створювати ризик зараження для працівників лабораторії.

Ще Allen [5] визначив, що 99 % (184 з 186) мазків мокротиння не були достатньо стерилізовані фіксацією у полум'ї. В інших дослідженнях,

де для фіксації використовували нагрівання при 75 °С протягом 2 годин, матеріал було знято стерильним тампоном і культивовано у рідкому живильному середовищі, ріст мікобактерій туберкульозу відзначено в 60 % (6 з 10) зразків (Blair et al., 1972) та у 80 % (8 із 10) досліджуваних мазків (Goldfogel & Sewell, 1981). Peluffo and Kantor (1984) в своїх дослідженнях визначили, що 87 з 171 (50,9 %) термічно фіксованих мазків мокротиння дали ріст культур мікобактерій. Тобто, отримані нами дані підтверджують ненадійність фіксації та знезараження мікобактерій широко використовуваними і сьогодні методами термічної обробки.

### Висновки

Нами використано методику мікрокультивування мікобактерій на предметних скельцях в мазках харкотиння (n=52) після звичайної фіксації в

полум'ї пальника, фіксації нагріванням при 75 °С протягом двох годин і після фарбування за методом Циля-Нільсена.

В усіх мазках, фіксованих в полум'ї пальника, мікобактерії туберкульозу певний час залишилися живі – одразу після фіксації (n=23), через 24 год (n=9), 48 год (n=9), 72 год (n=6) і сім діб (n=5). В мазках, фіксованих нагріванням при 75 °С протягом двох годин, та в пофарбованих препаратах, росту мікобактерій не виявлено.

Результати дослідження свідчать, що термічна фіксація в полум'ї не є достатньо надійною. У ряді випадків не забезпечується знезараження матеріалу. В мазках, фіксованих у полум'ї пальника, мікобактерії ще проявляти життєздатність (принаймні до семи діб), що являє небезпеку для лабораторного персоналу.

Використання спеціальної нагрівальної платформи для фіксації біологічного матеріалу при 75 °С протягом 1,5 год забезпечує надійну фіксацію.

У сучасних умовах доцільно проводити процедуру термічної фіксації з дотриманням чіткого контролю за температурою і експозицією, наприклад з використанням сухожарових шаф або спеціалізованих пристроїв.

### Література

1. Методические рекомендации по контролю качества лабораторной диагностики туберкулеза методом прямой микроскопии мазка мокроты, окрашенного по Цилю-Нильсену. – Донецк, 2004. – 19 с.
2. Наказ МОЗ України від 06.02.2002 р. №45. – Інструкція з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції.

3. Survival of Tubercle Bacilli in Heat-fixed and Stained Sputum Smears Celso Luiz Cardoso/+ / [L.R. Bigao Giacomelli, C. Helbel, J.J. Sant. Ana et al.] // Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). – 2001. – Vol. 96, N 2. – P. 277-280.

4. Method for inactivating and fixing unstained smear preparations of mycobacterium tuberculosis for improved laboratory safety / [P. Chedore, C. Th'ng, D.H. Nolan et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40, N 11. – P. 4077-4080.

5. Allen B.W. Survival of tubercle bacilli in heat-fixed sputum smears / B.W. Allen // Pathol. – 1981. – Vol. 34, N 7. – P. 719-722.

6. Chandrasekaran Sujatha. Modified sputum microscopy techniques sparing the use of alcohol for field application / Sujatha Chandrasekaran, T.R. Sreenivas, K. Chaudhuri // Ind. J. Tub. – 1991. – Vol. 38. – P. 87.

### SURVIVAL OF TUBERCULOSIS BACILLI IN HEAT-FIXED AND STAINED SPUTUM SMEARS FOR GENERALLY ACCEPTED METHODS

H.O. Kovalyova

*SUMMARY. To detect tuberculosis bacilli surviving in sputum smears after fixation and Ziehl-Neelsen staining used a slide culture. Fixation of biological material at 75 °C for 1.5 hours and in stained preparations reliably disinfected object. After fixation in the flame of the burner in all smears for 7 days mycobacterium tuberculosis remained living. Viable tubercle bacilli remaining in heat-fixed sputum smears may present an infection risk to laboratory staff.*

**Key words:** fixation, mycobacteria, sputum smears, slide culture.

Отримано 10.10.2011 р.