

1. Бологова З. Н. В сб.: Вопросы высшей нервной деятельности применительно к задачам клиники. М., 1965, стр. 18.
2. Воробьева Т. М. Ж. ВНД, 1977, XXVII, 2, стр. 252.
3. Григорян В. З. Докт. дисс. Ереван, 1963.
4. Гулямов М. Г., Малкин Б. Т. Здравсохранение Таджикистана, 1964, 2, стр. 37.
5. Деглин В. Я., Осберг И. Ю. Тез. и реф. докл. годичной конф. ин-та психиатрии МЗ РСФСР. М., 1955, стр. 90.
6. Крамова А. А. В сб.: Вопросы борьбы с алкоголизмом. Харьков, 1958, стр. 52.
7. Крушинский Л. В. Формирование поведения животных в норме и патологии. М., 1960.

УДК 616—091.8+616—076:615.372

Н. Д. ВАРТАЗАРЯН

К МЕТОДИКЕ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОБОВ В ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗАХ ПО ГРАМУ

Предложена модификация метода Грама для идентификации микробов в гистологических срезах. Метод позволяет выявить в ткани не только грам-положительные и грам-отрицательные бактерии, но и судить о гистоструктуре ткани.

Метод Грама и его различные модификации в настоящее время являются лучшими для выявления микробов в гистологических срезах [2, 4, 7]. Наряду с бактериологическим исследованием данный метод позволяет провести бактериоскопическое исследование инфицированных органов и тканей с целью выявления локализации внутритканевых микробных очагов, а также механизмов взаимодействия макро- и микроорганизмов. Такой метод бактериоскопического анализа, основанный на изучении микробов в срезах, приобретает большое значение также в связи с широким применением антибактериальных препаратов, снижающих жизнеспособность микробов, в результате чего они плохо выделяются на питательных средах.

Следует отметить, что в различных модификациях метода Грама, предложенных для окрашивания срезов, имеются отличия как в последовательности использования необходимых растворов и концентрации красителей, так и в способе дифференцировки, которые существенно отражаются на результатах исследований. Наиболее распространенным в патогистологической практике является модификация [1, 8], предложенная Вейгертом, где дифференцировка производится анилиновым маслом, тогда как в классическом методе Грама с этой целью используется спирт. Преимуществом метода является то, что наряду с грам-положительными микробами удается в тканях идентифицировать фибрин. Однако этот метод имеет и недостатки—не выявляет грам-отрицательные микробы. Заслуживают внимания также методы Brown, Norpps, Engebaek и соавт. [4—6], позволяющие одновременно определить в срезах как грам-положительные, так и грам-отрицательные микробы.

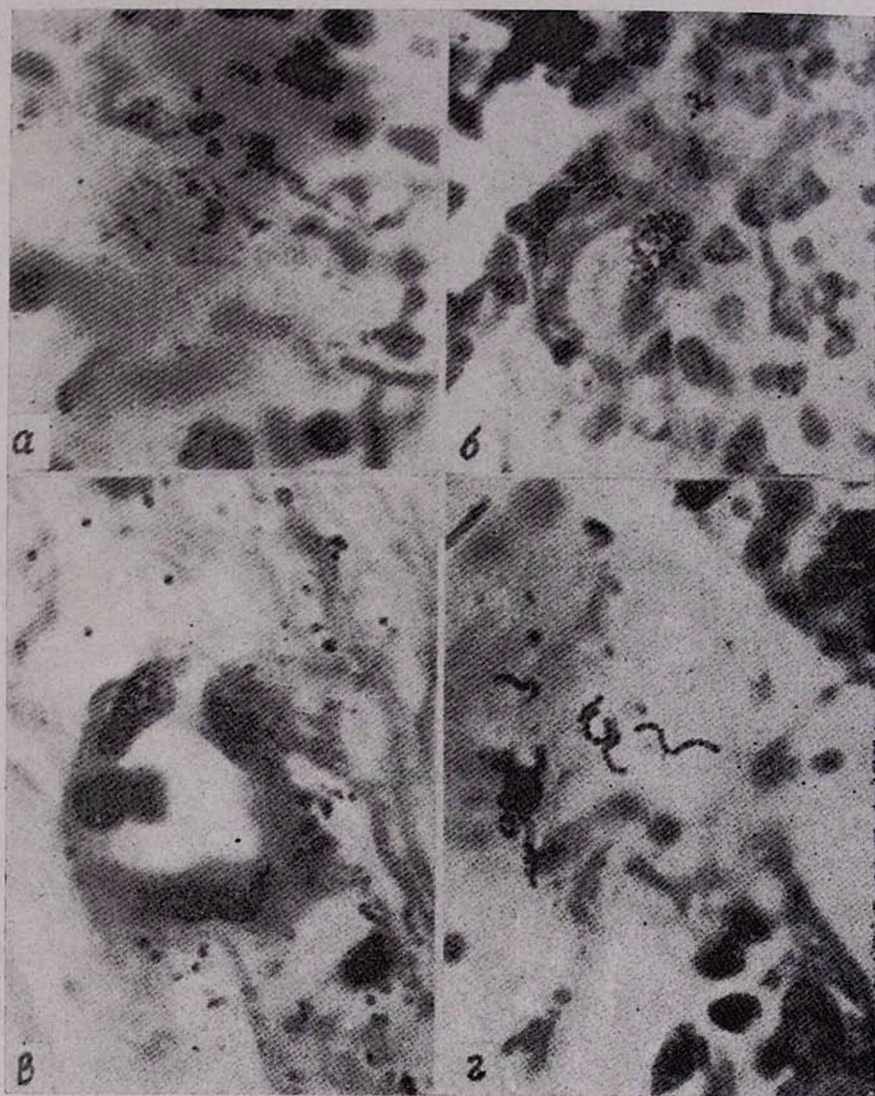


Рис.

Внутриклеточные микробные очаги небных миндалин. а—грам-отрицательные микробы в соединительной ткани трабекулы миндалины; б—макрофаг, перегруженный грам-положительными кокками в лимфоидной ткани; в—множественные грам-отрицательные микробы в периваскулярной ткани; г—цепочки стрептококка в крипте миндалины. Окраска модифицированным методом Грама. Сб. $\times 90$, ок. 7.

В качестве дифференцирующего средства авторы используют пикриновую кислоту и ацетон. Однако эти методы также не лишены недостатков в связи с частым переокрашиванием ткани. Использование Brown и Norris [5] основного фуксина способствует удалению кристаллического фиолетового из грам-положительных бактерий в отличие от карболфуксина, который, по данным Engebaek и соавт. [6], такими свойствами не обладает.

На основании сравнительного изучения методов, приведенных выше, и результатов собственных исследований нами предложена модификация, при которой окрашивание срезов и их дифференцировка проводится в два этапа: 1) окраска препаратов кристаллическим фиолетовым и дифференцировка для выявления грам-положительных бактерий; 2) окраска карболфуксином и дифференцировка грам-отрицательных бактерий от бактерий и тканевых структур.

Нами изучались 10 пар небных миндалин, удаленных у больных хроническим тонзиллитом, и кусочки легких 5 трупов, умерших от пневмонии. Кусочки фиксировались в 10% нейтральном формалине в течение 24 часов, далее в 10% формальдегиде на 50° спирте также в течение 24 часов, затем обезживались в восходящих спиртах и заливались в парафин.

Необходимые растворы: 1) 1% раствор генцианвиолета—100 мл (приготовить генцианвиолетовую бумагу—пропитать фильтровальную бумагу раствором краски и высушить); 2) раствор Люголя: йод кристаллический—1,0 г, калий йод—2,0 г, дистиллированная вода—300 мл; 3) исходный раствор карболфуксина: фуксин—1,0 г, фенол—5 г, абсолютный спирт—10 мл и дистиллированная вода—100 мл. Рабочий раствор карболфуксина готовится смешиванием 10 мл исходного раствора с 50 мл дистиллированной воды; 4) раствор Gallegòs: концентрированный формалин—1 мл, ледяная уксусная кислота—0,5 мл, дистиллированная вода—50 мл; 5) пикриновая кислота—0,25 г, ацетон—500 мл; 6) ацетон абсолютный—50 мл, ксилол—50 мл.

Методика окраски

Серийные депарафинированные срезы толщиной 5 мк довести до воды. Покрывать срез генцианвиолетовой фильтровальной бумагой, капнуть 3—4 капли дистиллированной воды и продержать в течение 5 минут. Удалить бумагу и промыть срез проточной водой до прекращения отхождения краски. Прoderжать срезы в растворе Люголя в течение 5 мин. Промыть срезы водой. Фильтровать срезы надавливанием фильтровальной бумагой. Погрузить срезы в ацетон до прекращения отхождения синей краски. Промыть водой до полного удаления ацетона. Красить срезы рабочим раствором карболфуксина в течение 5 минут. Быстро промыть в проточной воде. Прoderжать в растворе Gallegòs 5 мин. Промыть в проточной воде. Удалить воду из среза фильтровальной бумагой. Погрузить срезы в ацетон в течение 2 сек, пикриновую кислоту и ацетон 3 сек, ацетон 2 сек, ацетон-ксилол 3 сек, ксилол 5 сек, ксилол 1 мин. Заклyчить срезы в полистирол.

Результаты

Грам-положительные бактерии окрашиваются в синий цвет, грам-отрицательные—в красный, ткань в основном желтая, ядерные структуры ярко-красные. Следует отметить, что короткая продолжительность (2 сек) погружения срезов в 0,05% раствор пикриновой кислоты в ацетоне приводит к надежной дифференцировке грам-отрицательных бактерий и желаемой желтой окраске тканей (рисунок).

Для получения хороших результатов следует обратить внимание на процесс обезвоживания срезов фильтровальной бумагой: при сверхмерном давлении на срез вследствие уплотнения препарата, а также его высушивания резко затрудняется дальнейший процесс дифференцировки, в связи с чем препараты оказываются сверхокрашенными; при недостаточном надавливании на срез и обезвоживании ткани наблюдается его быстрое обесцвечивание в связи с неконтролируемой дифференциацией грам-отрицательных бактерий, особенно при их малом содержании в ткани. В каждом случае в зависимости от характера использованного материала следует опытным путем определить также рабочую концентрацию карбол-фуксина, пикриновой кислоты в ацетоне и продолжительность дифференцировки. Для тканей, фиксированных в спирте, следует использовать 1% раствор карболафуксина в количестве 5 мл в 50 мл дистиллированной воды, или же более низкие концентрации—1 мл в 50 мл дистиллированной воды. Более концентрированный рабочий раствор карболафуксина необходим для хорошей окраски грам-отрицательных бактерий в срезах, фиксированных формалином, глутаральдегидом или раствором Ценкера. Что касается качества окраски срезов в зависимости от способа фиксации материала (спирт и формалин), то между ними особых отличий не наблюдалось.

Таким образом, проведенные исследования показали преимущество предложенной модификации, позволяющей четко выявить грам-положительные и грам-отрицательные микробы, а также получить данные о локализации как внутритканевых микробных очагов, так и о гистоструктуре ткани.

Кафедра патанатомии Ереванского медицинского института Поступила 4/VII 1980 г.

Ն. Դ. ՎԱՐԴԱՋԱՐՅԱՆ

ՀԻՍՏՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՀԱՏՎԱԾՆԵՐՈՒՄ ԸՍՏ ԳՐԱՄԻ ՄԻԿՐՈԲՆԵՐԻ ՈՐՈՇՄԱՆ ՄԵԹՈԴԻ ՎԵՐԱԲԵՐՅԱԼ

Գրամի մեթոդով ներկված և այլ հեղինակների կողմից առաջարկված մեթոդներով հյուսվածքների հատվածների բակտերիոսկոպիկ հետազոտության արդյունքների անալիզը թույլ է տվել առաջարկել նոր ձևափոխված մեթոդ: Վերջինս հնարավորություն է տալիս հյուսվածքներում պարզորոշ կերպով հայտնաբերելու ինչպես գրամ-դրական, այնպես էլ գրամ-բացասական միկրոբները: Խրոնիկական տոնզիլիտով հիվանդների նշխաններից և թոքաբորբից մահացած երեխաների դիակներից վերցրած թոքերի հատվածների ուսումնասիրությունը ցույց է տվել ձևափոխված մեթոդի առավելությունը,

որը հնարավորութիւն է տալիս պարզելու ինչպէս ներհյուսվածքային միկրո-
բային օջախների տեղակայումը, այնպէս էլ հյուսվածքի կառուցվածքային
առանձնահատկութիւնները:

N. D. VARTAZARIAN

ON THE METHODS OF MICROBES IDENTIFICATION IN HISTOLOGIC CUTS ACCORDING TO GRAM

The modification of the Gram method for identification of microbes in histologic cuts is suggested. The method allows to reveal in the tissue gram-positive and gram-negative bacteria, as well as to judge about the tissue histostructure.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники. Л., 1969.
2. Лули Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М., 1969.
3. Adams E. Stain Techn., 1975, 50, 227.
4. Brown R. C., Hopps H. C. Amer. J. Clin. Path., 1973, 60, 234.
5. Brown R. C., Hopps H. C. Histo-Logic, 1978, 8, 1, 108.
6. Engebaek K., Johnsen K. S., Johnsen M. E. Ugeskr. Laeg., 1977, 139, 40, 2385.
7. Humberstone F. D. J. Med. Lab. Technol. 1963, 20, 153.
8. Taylor R. D. Amer. J. Clin. Path. 1966, 46, 472.

УДК 616.155.02+616+411]—097

И. С. КАСПАРОВА, А. В. АЗНАУРЯН, Э. С. АКОПДЖАНЫН

ГИСТОФЕРМЕНТАТИВНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОУЗЛОВ И СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ АНТИГЕННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Изучены структурно-функциональные особенности Т- и В-зон лимфоузлов и селезенки у подопытных крыс в различные сроки иммунизации с помощью гистоэнзимологических маркеров.

Установлено, что по локализации активности различных ферментов можно определить Т- и В-зависимые зоны в этих органах.

Установлено, что лимфоузлы и селезенка являются периферическими органами иммуногенеза [6]. Именно в этих органах происходят структурные и функциональные изменения, являющиеся ответом на антигенное раздражение. Принято разделять функциональные зоны лимфоузлов и селезенки на Т- и В-зависимые. К В-зависимым зонам относят лимфоидные фолликулы лимфоузлов и селезенки, а к Т-зависимым — паракортикальную зону лимфоузла и область, расположенную вокруг центральной артерии селезенки. Тимус-зависимые зоны представлены Т-лимфоцитами [3].

Несмотря на значительные достижения в области иммуноморфологии периферических органов иммунитета, многие вопросы структуры и функции лимфоузлов и селезенки остаются невыясненными. Так, име-