

# K METHODICE BARVENÍ POUZDER A HLENOVÝCH SCHRÁNEK MIKROBIELNÍCH.

(Popis nové barvicí metody.)

Doc. Dr. F. PATOČKA a Dr. J. ILAVSKÝ.

*Zvláštní otisk*

z „ČASOPISU LÉKAŘŮ ČESKÝCH“

roč. 1937, č. 32.



V PRAZE 1937.

NÁKLADEM VLASTNÍM. TISKEM DR. ED. GRÉGRA A SYNA V PRAZE.

*Světlym reprodukovaným na Blauke  
a věnuji s tím souvisejí  
věnuje H.*

Zvláštní otisk z Časopisu lékařů českých čís. 32, roč. 1937.

## **K methodice barvení pouzder a hlenových schránek mikrobielních.**

(Popis nové barvicí metody.)

Doc. dr. F. PATOČKA a dr. J. ILAVSKÝ.

Z Bakteriologicko-serologického ústavu univ. Karlovy  
v Praze.

Naše stručná studie, která jest příspěvkem k tematatu oplývajícímu skutečnou spoustou method, n sleduje žádný zvláštní vědecký cíl, nýbrž chce prospěti v pedagogickém povolání universitního učitele. Při mikrobiologickém praktiku se nezbytně dojde, a to obyčejně dosti záhy, ke znázorňování tak zv. pouzder bakterielních, t. j. ke kapitole, které se nelze vyhnouti a jejíž praktické výsledky, jsou-li korunovány úspěchem, svým estheticky pěkným a velmi názorným výsledkem značně povzbudí pracovní dychtivost. Jak již vytčeno, method k výtěru, které jsou schopny dáti dobré výsledky, je celá řada. Téměř ke třiceti. A zde jest jádro problému: vybrati z nich takovou, která za všech okolností i v rukou necvičeného dobré výsledky dávati musí. Po dlouholetých zkušenostech v začasté hojně navštěvovaných praktikách byli jsme nuceni ztotožniti se se zkušeností Kabelíkovou, že totiž nejspolehlivější v rukou mladých, nezkušených pracovníků jest negativní znázornění pouzder s tuší, ať již v preparátech nativních, nebo fixovaných. Spolehlivost úspěchu jest však také jedinou výhodou této metody. Jejích záporných stránek jest více; neřekne totiž nic o odlišném složení pouzdra (příp. schránky), zkresluje jeho tvar i velikost, sekundární dobarvení v negativu ležících

těl bakteriálních dopadá obyčejně špatně a co je hlavní, nelze jí použítí pro nátěry z orgánů infikovaných zvířat. Z těchto důvodů jsme si několikrátě propracovali některé z method skutečně pouzdra barvicí, ale když jsme je předložili praktikujícím posluchačům, byli jsme vždy stejně zklamáni. Každá z nich má svou vynikající hodnotu, ale jen v rukou velmi zkušeného. Konečně v poslední době se nám podařilo vypracovati methodu, která v dnešní modifikaci, zkoušena na mnoha stech preparátech, dává téměř vždy stejně dobré výsledky, je velmi jednoduchá, citlivá, po stránce barevného rozdílu mezi pouzdrem a mikrobem velmi nápadná a esthetická a hlavně tak dobře technicky zvládnutelná, že hned napoprvé jsme s ní docílili v praktiku u většiny posluchačů nečekaně dobré výsledky. V naději, že prokáže jinde tytéž služby, co prokázala nám, a to hlavně v praksi vyučovací, předkládáme ji veřejnosti. Jsme si vědomi, že řešení spočímá na stejných principech, jako u většiny method ostatních. Přesto však, že se jiným methodám podobá, nepodařilo se nám ji tak, jak my ji provádíme, nikde najítí popsánu a proto si troufáme pokládati tuto modifikaci, pokud je to vůbec u podobných method na místě, za původní.

Chceme-li se přidržeti Kabelíkova rozdělení barvicích method tohoto druhu na metachromatické a vícebarevné, patřila by naše mezi metachromatické. Považujeme za zbytečné citovati zde jednotlivé metody tak, jak jsme je v literatuře, doufáme, že úplně, shledali; starší z nich jsou souborně citovány v příručkách a kompendiích, které uvádíme v seznamu literatury, z novějších se nám zdá býti pozoruhodnější methoda Baileyova (1929) s karbofuchsinem a anilinovou gentianovou violetí, methoda Olitzkyho a Tylera (1930), methoda Sabatucciho (1931), methoda Churchmanova s Wrightovou modří (1932), která se zdá býti naší

métodě nejpodobnější a metoda Howie a Kirkpatrickova s fuchsínem a eosínem (1934). Od všech citovaných liší se naše metoda použitím barviva, které se ukázalo i pro tento účel nad jiné vhodným, ač zde právě ku podivu dosud nikdy použito nebylo; tímto barvivem jest tak zv. Borrelova modř. Dále jest odlišnou látka sloužící k diferencování, kterou jest zředěný roztok taninu, i jeho aplikace. Tohoto, pokud jsme se mohli přesvědčiti, bylo sice použito v některých modifikacích jako mořidla, ale nikoliv jako diferenciačního činitele, jak my ho užíváme. K docílení opravdu úspěšných preparátů, zejména ze zvířecích orgánů, jest však nutno splniti stejně dokonale dvě důležité podmínky. První jest přesná příprava barviva a cílevědomé — ne otrocké — dodržování tinkčních principů (splnění této podmínky jest celkem snazší, neboť metoda jest do té míry pružná, že nejen snáší, nýbrž i téměř vyžaduje individuální odchylky, podle různorodosti preparátů). Druhou, nejméně stejně důležitou, která bývá obvykle málo zdůrazňována, jest příprava materiálu, z něhož se preparáty zhotovují. I této kapitole věnujeme na konec několik slov z vlastní zkušenosti.

Považujeme za nemístné v rámci těchto methodických údajů zacházeti na podstatu onoho, určitě nejednotného úkazu, který je běžně nazýván bakteriálním pouzdrem, ani rozebíratí — podle našeho názoru správný — názor Ettinger-Tulczynské na pouzdra vlastní a t. zv. hlenové schránky mikrobiální. Netroufáme si zacházeti ani do podrobností chemických, případně fyzikálně-chemických reakcí, které se odehrávají mezi různými složkami metachromatické Borrelovy modře a substancí pouzdernou, případně plasmatem mikrobiálním, ačkoliv na základě velmi četných zkušeností s pouzdry a schránkami nejrozličnějšího původu máme dojem, že jde o velice citlivou mikrochemickou

reakci, která by leccos mohla ukázati, použita jako poměrně jednoduchý indikátor, ze změn v jejich složení.

Borrelova modř, u nás téměř nepoužívaná, a ostatně od zavedení Giemsova barviva i ve Francii téměř zapomenutá, je jednou z nejlepších metachromatických methylenových modří vůbec. Mimo zbytky nepolychromatické methylenové modře obsahuje velmi vysoká kvanta methylenového azuru a methylenové violeti, které jsou oxydačními produkty čisté methylenové modře a podmiňují právě její polychromasii. Kdežto však většina polychromatických methylenových modří, jako je modř Löfflerova, modř Unnova, nebo modř Michaelisova se vyrábí pozvolnou oxydací buď za současného úmyslného přidání alkalií (následkem toho při některém použití musí býti neutralisována), nebo dlouhodobým stárnutím obyčejné methylenové modři ve skleněné nádobě, při čemž se potřebná kvanta alkalií uvolňují rozpouštěním skla, tvoří se modř Borrelova v prostředí s počátku neutrálním, oxydací za přítomnosti kysličníku stříbrného. Podle dřívějších zkušeností, které s tímto barvivem máme, považujeme je za daleko lepší, stálejší a polychromatičtější, nežli je na př. boraxová modř Sahliho, nebo Mansonova, nebo Proeschera a Kruegerova polychromatická modř, vyrobená za přítomnosti peroxydu sodíku. Přesto, že je barvivo ve vodním roztoku, vydrží podle našich zkušeností několik měsíců.

Přípravu doporučujeme následující: za prvé si zhotovíme 100 ccm 1% roztoku čisté methylenové modře v neutrální destilované vodě, a to krátkodobým zahřáním na vodní lázni téměř k bodu varu, čímž docílíme úplného rozpuštění veškerého barviva. Volba chemického preparátu není lhostejná; naprosto se nám neosvědčila methylenová modř Merckova, velmi dobrých výsledků jsme dosáhli

s methylenovou modří Höchstovou a nejlepšího s methylenovou modří Grüblerovou (Methylenblau rectific. n. Ehrlich-dr. Grübler, Leipzig). Za druhé si připravíme kysličník stříbrný, a to následujícím způsobem: Ve skleněné baňce si rozpustíme přibližně 1 g argentnitrátu a přiléváme k němu 3% roztok louhu tak dlouho, pokud se tvoří žlutá sraženina kysličníku stříbrného. Vytvořená sraženina, která rychle šedne, se promývá tak dlouho destilovanou vodou (na př. přes filtrační papír), až vytékající tekutina je neutrální reakce. Prášek, zbylý na filtračním papíře, spláchneme do široké nádoby (aby tekutina zde se nacházející byla v tenké vrstvě a měla co možná nejširší kontakt se vzdušným kyslíkem), a přelejeme předem připraveným roztokem methylenové modře. Nádobu uzavřeme papírovou zátkou a uložíme na temné místo při pokojové teplotě na dobu asi 3 neděl, při čemž každý den jednou nebo dvakrát několik minut obsah nádoby protřepáváme. Po 3 nedělích nabude modř charakteristického nafialovělého tonu a může se dekantovati, při čemž, je-li dobře uschována, vydrží i půl roku.

K diferenciaci, jak již shora uvedeno, užívá se vodní roztok taninu, a to buď v jediné koncentraci, t. j. v roztoku  $\frac{1}{2}\%$  ( $\frac{1}{2}\%$  acidi tanici puris. v destilované vodě) po dobu 5 až 10 vteřin, nebo ve dvou postupných koncentracích, a to nejdříve opět  $\frac{1}{2}\%$  a nato koncentrovanější (1 až 5%), při čemž však doba působení u každého z různých roztoků jest značně kratší, nežli v prvém případě. Na základě nabytých zkušeností nemůžeme doporučiti diferencování ihned taninem koncentrovanějším (na př. 5%), neboť pak musí býti doba diferenciacie tak krátká, že se nedá vůbec dobře odhadnouti a mimo to v nestejně tlustých místech preparátu dostaneme velmi nestejně výsledky. Vysvětlení, proč je možno dostati dobré výsledky s postupně koncentrova-

nějšími roztoky taninu, ale nikoliv ihned s taninem koncentrovaným, nám chybí. Také máme dojem, že právě tanin jest to, který vůbec umožnil použití Borrelovy modře pro naše účely, neboť tato sama o sobě aplikována po dobu, která bude níže uvedena, přebarví preparát až do naprosté nezřetelnosti a nedá se na př. destilovanou vodou oddiferencovati. Máme k tomu ostatně i doklad z cizích zkušeností, tak na př. Heim, jeden z prvých, který zavedl a propracoval Weichselbaumův návrh na použití methylenové modře pro barvení pouzder, tvrdí, že vysoce polychromatická methylenová modř se k tomuto účelu vůbec nehodí.

Nejuniversálnější typ naší metody jest následující:

1. Preparát je fixován 3 až 4 minuty methylalkoholem.

2. Barvení Borrelovou modří po dobu 3 až 5 minut podle hustoty preparátu.

3. Rychlé opláchnutí pod vodovodem.

4. Diferencování 5promilovým roztokem taninu po dobu 5 až 10 vteřin, podle toho, jak preparát mění barvu.

5. Opláchnutí vodou a osušení.

Při diferencování poznáme optimální okamžik, ve kterém jsme nuceni práci přerušiti podle toho, že preparát z původní tmavé, modřefialové barvy nabude náhle tónu růžově načervenalého. Po oschnutí ovšem i dobře diferencovaný preparát zase zřívá. Tento pracovní postup je vhodný zejména pro preparáty hustší, na př. pro nátěry ze sleziny, z jater, nebo z hustých hnisů. Pro jemnější preparáty doporučujeme diferenciaci dvojitou. Nejprve asi na 3 vteřiny 5promilovým roztokem taninu, načež klidně můžeme aplikovati tanin koncentrovanější, na př. i 5% po dobu 4 až 5 vteřin. Pro preparáty velmi jemné, na př. z krve, u mikrobů obdaných pouzdry poměrně gracilními (pneu-

mokokky), dostali jsme nejlepší výsledky Borrelovcu modří ředěnou ještě  $\bar{a}\bar{a}$  destilovanou vodou, při čemž se doba barvení příslušně prodlouží, a to až na 8 minut, diferenciace však zůstává stejná. Vůbec je možno koncentraci barviva, délku barvení i délku diferenciace měniti podle charakteru preparátu, při čemž, jako je tomu u všech barvicích method vůbec, je nutno se řídit spíše citem, nežli naprosto přesným dodržováním jednotlivých fází metody. Celkem však, na rozdíl od všech ostatních method, které jsme měli příležitost zkoušet (a to považujeme za hlavní přednost naší metody), i nezkušený musí dostat při prvním použití této metody výsledek slušný a po několikerém opakování velmi dobrý. Barevné výsledky takto docílené jsou tak efektní, že prohlížející skutečně těžko uvěří, že jich bylo docíleno pouze jediným barvivem a diferenciací, bez kontrastního dobarvování.

Barevný efekt u dobrého preparátu jest asi následující:

1. u nátěrů z orgánů: homogenní pozadí preparátu je šedězelené, erythrocyty intensivněji zelenomodré. Buněčné elementy jsou krásně fialové se zřetelnou vnitřní strukturou, pouzdra jsou jasně červená, někdy s narůžovělým nádechem. Těla mikrobielní tmavě fialová nebo fialověmodrá. Kontrast šedězelenavého pozadí, fialové a svítivě červené je velmi nápadný a esthetický. V krevním nátěru jsou erythrocyty žlutavé až zelenavěmodré, lymphocyty fialové, jádra leukocytů krásně fialová, protoplasma leukocytů nafialověle modrá, o něco bledší nežli jádro, velmi dobře se od něho odlišující. Vnitřní struktura buňky dobře patrná. Pouzdra mikrobů jsou opět intensivně růžověčervená, protoplasma fialověmodrá. Různou modifikací v délce působení barviva nebo taninu jest možno barvení odstupňovati na několika nátěrech



z téhož objektu, a to tak, že buď je barva pouzder intensivěji červená a tedy opticky vzhlednější, ale jejich kontury jsou o něco méně ostře v okolí vyznačeny, nebo jsou tato bleději zbarvena, zejména ve střední části kolem bakteriálních těl a pak je jejich kontura tak určitě vyznačena, jako by přímo na preparátu byla vykreslena tuší. První preparáty jsou vhodnější pro demonstraci v mikroskopu, druhé jsou zvláště účelné pro mikrofotografii.

2. Pochopitelně jsme také zkoušeli preparáty z kultur. Barevný efekt jest zde zcela jiný a poněkud chudší (zřejmě vlivem jiné chemické skladby mukosního obalu) nežli u pravých pouzder z orgánů, ale i zde v některých případech dobře patrný. Důležitou podmínkou jest roztírati kulturu hlenovitého mikroba s obyčnou vodou a nikoliv s fyziologickým roztokem, který při vysychání, patrně v důsledku zvýšeného osmotického tlaku, podmiňuje sraštění schránky. Postup barvení je asi stejný, jako při barvení preparátů z orgánů, pouze při diferenciaci taninem protáhneme jeho působení tak dlouho, až preparát z původní modro-fialové barvy začne nabývati, jako v hořejším případě, barvu narůžovělou, ale nepřeručíme zde, nýbrž pokračujeme ještě o něco dále, až preparát opět lehce zmodrá. Teprve nyní je barvení skončeno, opláchneme a osušíme. V dobře zbarvených preparátech jsou mukosní schránky **m o d r a v ě z e l e n ě** a těla mikrobiální **r ů ž o v o - f i a l o v á**, až modrá. Kontrast mezi barvou mikrobiálního protoplazmatu a pouzdernou substancí je velmi dobrý, ohraničení pouzder bývá někdy méně určité, nežli v preparátech z orgánů. Ještě nápadnější barevné kontrasty vzniknou, když k vytvoření suspense použijeme zředěného sera. Po dokonalé diferenciaci je pozadí (serum) krásně růžové, pouzdra světle modrá a mikroby tmavěji modro-fialové.

3. Velmi podobný efekt barevný, jako při bar-

vení preparátů z kultur, dostaneme u preparátů opouzdřených mikrobů z peritonea zvířat. Výjimku ovšem tvoří bacil anthraxu, který se i zde chová jako ve slezině, nebo v krvi.

K zakončení dovolíme si připojiti několik poznámek o druhé složce, nezbytné k docílení úspěchů, t. j. o přípravě materiálu, nutné pro zhotovování dobrých preparátů. Klasickým objektem jest a zůstane myška (o něco méně vhodné morče), naočkovaná bacilem anthraxu. Nejlepší výsledky lze dostati silně virulentním kmenem bacila anthraxu, který byl očkován jednoduchým vpíchem injekční jehly, namočené ve 24hodinové bouillonové kultuře tohoto mikroba, pod kůži ocásku. Ze 20 myšek očkovaných tímto způsobem zašlo 18 do 20 hodin, 2 do 24 hodin. Ve všech byla velmi krásně barvitelná pouzdra. Méně virulentní kmen, zejména je-li inokulován ve velkých dávkách, dává výsledky značně horší. Naprosto nezbytnou podmínkou jest zhotoviti preparáty ihned po smrti zvířete. Velmi krásné obrazy, ovšem daleko gracilnější, lze dostati z myšek, očkovaných virulentními kmeny pneumokoka. Opět nejlepší výsledky dával pneumokokus III, o něco menší, ale stejně dobře barvitelná pouzdra dávaly virulentní kmeny pneumokoka I a II. Očkování i zde se dělo malými dávkami virulentního kmene, a to pouze cestou subkutánní. Inokulace intraperitoneální nedala nikdy tak dobrých výsledků; kdežto však u bacila anthraxu byly nejhezčí preparáty ze sleziny, u pneumokoků je daleko předčily preparáty z krve. Při infekci zvířat cestou intraperitoneální mikroby ze skupiny tak zv. opouzdřenců (na př. pneumobacilem, bacteriem lactis aerogenes) lze docílit jenom vzácněji hezkého preparátu již proto, že pouze určitá část jedinců mikrobielních zachovává v peritoneu svoji charakteristickou mukosní schránku.

Jejich tinkce pak je (pochopitelně) úplně rozdílná od pouzder anthraxových, nebo pneumokokových, takže se preparáty blíží oněm, zhotoveným z kultur. Nátěry z kultur nevyžadují žádných zvláštních podmínek, pouze vhodný výběr kmenů, které mají býti pokud možno čerstvě izolované. Zkoušeli jsme barviti kultury pneumokoka III, bacterium lactis aerogenes, bact. rhinoscleromatis, bact. ozaenae a pneumobacila Friedländerova. U pneumokoka III jsou nejlepší asi 20hodinové kultury na krevním agaru, u opouzdřenců tyčinkovitých nejlépe vyhovují asi 30hodinové kultury, vyrostlé na glykosovém agaru při přibližně 25°. Skutečně efektních výsledků u kultur jsme však dosáhli pouze u zcela čerstvě izolovaných kmenů bacteria lactis aerogenes, u ostatních jmenovaných byly výsledky slabší, hlavně snad proto, že šlo o starší sbírkové kmeny.

Jen zcela letmo se zmíníme o zajímavých pozorováních, která byla učiněna u hlenovitých bakterií během vzrůstu, při vytváření mukosních schránek. Bylo lze pozorovati modrofialové tělo mikroba; obklopené růžovou vnitřní vrstvou a ostře ohraničenou modrou vrstvou zevní (bact. lactis aerogenes). Přes skutečně vynikající úspěchy, kterých jsme s naší methodou dosáhli, měli jsme tendenci považovati tento zjev za náhodný artefakt, podařilo se nám však najíti v literatuře (Churchman-Emelianoff), že podobné útvary byly i těmito autory pozorovány a popsány jako dvě pouzdrové membrány, mezi nimiž byl slabě barvitelný prostor. Je velmi pravděpodobné, že i náš výsledek ukazuje vývojové fáze stejného charakteru.

Je úkolem dalšího přezkoušení této metody a jejího adoptování i na nejrůznější jiné druhy mikrobielní, zda bude možno při nesporných výhodách naší metody prokázati pouzdra, nebo

hlenovitě schránky i u mikrobů (Churchman), u kterých, jak se běžně tvrdí, až do této doby prokázány nebyly, jak tomu má prý býti u některých bakterií ze skupiny tyfus-coli, u mikrobů acidoresistentních a R typů pneumokoků.

### Résumé.

Les auteurs donnent une description détaillé d'une nouvelle méthode de coloration des capsules microbiennes. Celle ci consiste en coloration par le bleu de Borrel, qui est suivie de différenciation par la solution de l'acide tannique à 50/90. Les résultats très remarquables (capsules rouge-clair, corps microbiens en violette foncé, noyaux des cellules violets, globules rouges, bleu pâle) s'obtiennent d'une extrême facilité, ce qui prouve, que la méthode est exceptionnellement bonne pour les travaux pratiques de microbiologie.

### Literatura.

1. **Hlava Honl**: Bakteriologie (1900). — 2. **Klimmer**: Techn. und Meth. d. Bakt. (1922). — 3. **Kraus-Uhlenhut**: Handb. der Mikr. Techn., Bd I, 341 (1923). — 4. **Calmette**: Man. techn. de microb. 108 (1926). — 5. **Kabelík**: Bakt. techn. drobn. 71 (1926). — 6. **Kolle-Kraus-Uhlenhut**: Gottschlich, Bd I, 17 (1928). — 7. **Kolle-Kraus-Uhlenhut**: Sobernheim, Bd III, 1044 (1929). — 8. **Langeron**: Préc. de microsc. 494 (1934). — 9. **Heim**: Arch. f. Hyg. XL, 55 (1901). — 10. **Legroux**: Past. Ann. 39, 382 (1925). — 11. **Bailey**: Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 27, 111 (1929). — 12. **Sabatucci**: Ann. Igiene 41, 77 (1931). — 13. **Churchmann-Emelianoff**: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 29, 514 (1932). — 14. **Churchmann-Emelianoff**: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 29, 966 (1932). — 15. **Churchmann-Emelianoff**: I. exper. Med. 57, 485 (1933). — 16. **Etinger-Tulczynska**: Z. Hyg. 111, 769 (1933). — 17. **Howie-Kirkpatrick**: J. Path. 39, 165 (1934).