

## Metode barvanja biološkega materiala

UDK 578.65:576.8.078

**POVZETEK.** *Avtorica ponazarja metode barvanja biološkega materiala, ki se uporabljajo za mikroskopsko spoznavo in razlikovanje celic oziroma bakterij (barvanje z metilenskim modrilom, barvanje po Gramu, barvanje po Ziehl-Neelsenu, barvanje po Ljubinskem in barvanje po Giemsi), sledijo metode, ki imajo poseben pomen v citodiagnostiki (barvanje po Pappenheimu in barvanje po Papanicolaou-u), na koncu pa sta dodani še metodi barvanja urinskega sedimenta (barvanje citomegalicnih inkluzijskih celic in barvanje po Sternheimerju in Malbinu). Za tem opisuje reagente, postopke in rezultate barvanja.*

**METHODS OF STAINING THE BIOLOGICAL SPECIMENS.** *The paper presents different stains employed in the microscopical identification and differentiation of cells and bacteria (methylene blue staining, Gram's method, Ziehl-Nielsen staining, Ljubinski's method and Giemsa method). Then, the author describes the methods of special significance for cell diagnosis (Pappenheim's method, Papanicolaou's method) and methods used in staining the urine sediment (staining of cytomegalic inclusion cells, Sternheimer-Malbin staining). Reagents, techniques and results of staining are described by the corresponding regulations.*

Barvanje biološkega materiala je za mikroskopijo zelo pomembno, saj omogoča lažjo identifikacijo in diferenciacijo celic oziroma bakterij. Uporabljamo naravna (npr. hematoksilin) ali sintetizirana (večinoma anilinska) barvila. Spособnost barvanja daje barvilom kromoforna atomska skupina. Kisla barvila vsebujejo kromoforno skupino v anionu in barvajo bazične sestavine celic, predvsem citoplazmo. Bazična barvila vsebujejo kromoforno skupino v kationu, zato se kot baze vežejo z nukleinskimi kislinami in tako obarvajo predvsem celična jedra.

Za identifikacijo in diferenciacijo bakterij v biološkem materialu uporabljamo večinoma naslednje metode:

- 1 — Barvanje z metilenskim modrilom,
- 2 — Barvanje po Gramu,
- 3 — Barvanje acidorezistenčnih bacilov po Ziehl-Neelsenu,
- 4 — Barvanje metakromatskih zrc po Ljubinskem,
- 5 — Barvanje po Giemsi.

V citodiagnostiki imajo najširšo uporabo naslednje metode barvanja:

- 1 — Barvanje po Giemsi,
- 2 — Barvanje po Pappenheimu (May-Grünwald-Giemsa),
- 3 — Barvanje po Papanicolaouu.

Med važnejša barvanja urinskega sedimenta pa prištevamo:

- 1 — Barvanje citomegaličnih inkluzijskih celic,
- 2 — Barvanje po Sternheimerju in Malbinu.

Razmaz biološkega materiala, ki ga želimo barvati, mora biti enak, razmazan na popolnoma čisto, razmaščeno in suho objektno steklo. Posušimo ga na zraku. Pred barvanjem ga fiksiramo, npr. z metanolom, v katerega potopimo preparat za 3—5 minut, ali pa s toploto tako, da je preparat z razmazom obrnjen navzgor, večkrat hitro potegnemo skozi plamen Bunsenovega gorilnika.

Pripravimo si nasičene alkoholne raztopine barvil, ki so, hranjene v temnih steklenicah, dolgo obstojne. Pred uporabo jih razredčimo z vodo.

#### BARVANJE Z METILENSKIM MODRILOM

Barvanje z metilenskim modrilom uporabljamo za orientacijsko barvanje, ki nas opozori na morfologijo bakterij.

**R e a g e n t i :**

1. Nasičena raztopina metilenskega modrila (po Löfflerju)

Metilensko modrilo 10 g

Koncentriran etanol 100 ml

Alkoholu dodamo barvilo, premešamo in pustimo stati 2 dni (medtem večkrat premešamo). Filtriramo in hranimo v temni steklenici.

2. Raztopina kalijevega luga

1 g KOH raztopimo v 100 ml destilirane vode.

3. Razredčena raztopina metilenskega modrila

Nasičena raztopina (1.) 30 ml

Raztopina KOH (2.) 1 ml

Destilirana voda 100 ml

**P o s t o p e k :**

Nad plamenom fiksiran razmaz biološkega materiala prelijemo z razredčeno raztopino barvila in barvamo 3 minute. Speremo z vodo in razmaz posušimo na zraku.

**R e z u l t a t :**

Bakterije se obarvajo temno modro.

#### BARVANJE PO GRAMU

Metodo barvanja po Gramu uporabljamo za identifikacijo večine bakterijskih vrst.

**P r i n c i p :**

Po Gramu pozitivne bakterije vežejo nase metilvijolično barvilo (metilviolet) in se z mešanico alkohola in acetona ne razbarvajo, medtem ko se po Gramu negativne bakterije razbarvajo. Da jih jasneje ločimo od gramsko pozitivnih, gramsko negativne bakterije kontrastno obarvamo z nevtralno rdečim barvilom (neutralrot).

## Reagenti:

1. Nasičena raztopina metilvijoličnega barvila

Metilviolet (gentiana violet) 10 g

Koncentriran etanol 100 ml

Fenol (Acidum carbol. liquefactum) 1 g

Alkoholu dodamo barvilo in fenol, pomešano in pustimo stati 24 ur. Filtriramo in hranimo v temni steklenici.

2. Razredčena raztopina metilvijoličnega barvila

Nasičena raztopina (1.) 1 ml

Destilirana voda 10 ml

3. Raztopina joda po Lugolu

KJ 2 g

Resublimiran jod 1 g

Destilirane vode do 300 ml

Kalijev jodid raztopimo v nekoliko tople vode, dodamo jod in ko se tudi ta raztopi, dopolnimo z vodo do 300 ml.

4. Raztopina nevtralnno rdečega barvila

Neutralot 0,1 g

Destilirana voda 100 ml

Barvilo raztopimo v vreli vodi, ohladimo in filtriramo.

5. Zmes acetona in etanola

Zmešamo 3 ml acetona in 97 ml koncentriranega etanola.

## Postopek:

Nad plamenom fiksiran razmaz biološkega materiala barvamo 2 minuti z razredčenim metilvijoličnim barvilom. Barvilo odlijemo in preparat speremo z vodo. Nanj nalijemo raztopino joda za 1 minuto, odlijemo in razbarvamo z zmesjo acetona in alkohola, ki jo dodajamo počasi po kapljicah tako dolgo, dokler so kapljice, ki odtekajo še obarvano modre. Preparat speremo z vodo, ga barvamo 1 minuto z raztopino nevtralnno rdečega barvila, ga ponovno speremo z vodo in posušimo na zraku.

## Rezultat:

Po Gramu pozitivne bakterije (stafilokoki, streptokoki, pnevmokoki itd.) se obarvajo temno modro do vijoličasto. Po Gramu negativne bakterije (meningokoki, gonokoki, Haemophilus influenzae, H. pertussis itd.) se obarvajo rdeče.

## BARVANJE PO ZIEHL-NEELSENSU

Metodo barvanja po Ziehl-Neelsenu uporabljamo za barvanje acidorezistentnih klic, med katere spada Kochov bacil (*Mycobacterium tuberculosis*). Acidorezistentnost dajejo mikobakterijam lipidi in višji alkoholi v citoplazemski membrani, še posebno voskasta mikolna kislina. Zato barvanje z anilinskimi barvili na običajen način ni mogoče, ker se barvilo preslabo veže.

## Princip:

S toploto in fenolom poškodujemo citoplazemsko membrano in tako omogočimo vezavo barvila, ki ga tudi močne kisline ne morejo več razbarvati. Mikrobo, ki niso acidorezistentni, kontrastno obarvamo z metilenskim modrilom.

### Reagenti:

1. Nasičena raztopina bazičnega fuksina

Fuksin 3,5 g

Koncentriran etanol 100 ml

Alkoholu dodamo barvilo, premešamo in pustimo stati 24 ur. Filtriramo in hranimo v temni steklenici.

2. Vodna raztopina fenola

Acidum carbolicum liquefactum 5 g

Destilirana voda 100 ml

Tresemo, dokler se fenol ne raztopi.

3. Razredčena raztopina bazičnega fuksina

Nasičena raztopina bazič. fuksina (1.) 1 ml

Raztopina fenola (2.) 10 ml

4. Solnokisli alkohol

3 ml koncentrirane solne kisline počasi dodajamo k 97 ml koncentriranega etanola.

5. Razredčena raztopina metilenskega modrila po Löfflerju.

### Postopek:

Nad plamenom fiksiran razmaz biološkega materiala prelijemo z razredčeno raztopino bazičnega fuksina in ga počasi segrevamo nad plamenom tako dolgo, da se začne iz barvila dvigati para. Pri tem barvilo ne sme zavreti ali se posušiti. Barvilo ohladimo in postopek segrevanja še dvakrat ponovimo. Preparat speremo z vodo, ga razbarvamo s solnokislim alkoholom (3—5 minut), ga ponovno speremo z vodo in nato barvamo 1—3 minute z razredčeno raztopino metilenskega modrila. Preparat speremo z vodo in ga posušimo na zraku.

### Rezultat:

Acidorezistentni bacili se obarvajo rdeče in so lepo opazni na modrem ozadju.

## BARVANJE PO LJUBINSKEM

Metodo dokazovanja metakromatskih zrn po Ljubinskem uporabljamo za identifikacijo bacilov davice (*Corynebacterium diphtheriae*).

### Reagenti:

1. Pioktanin

Destilirana voda 94,8 ml

Koncentrirana ocena kislina 5,2 ml

Pioktanin (*Pioktaninum coeruleum*) 0,25 g

Raztopino mešamo, dokler se pioktanin ne raztopi, in jo filtriramo.

2. Raztopina joda po Lugolu

3. Vezuvin

Vezuvin (*Bismarck-braun*) 0,1 g

Destilirana voda 100 ml

Vezuvin raztopimo v vreli vodi in še vročo raztopino filtriramo.

4. Koncentriran etanol

### Postopek:

Nad plamenom fiksiran razmaz biološkega materiala barvamo 3 minute z raztopino pioktanina. Barvilo odlijemo in razmaz prelijemo z raztopino joda za

2 minuti. Na hitro razbarvamo s koncentriranim etanolom ter preparat speremo z vodo. Sedaj preparat barvamo 5—10 minut z raztopino vezuvina, barvilo odlijemo, preparat speremo z vodo in ga posušimo na zraku.

**R e z u l t a t :**

Metakromatska zrnca se obarvajo modro in so lepo opazna na rumeno rjavem ozadju.

#### BARVANJE PO GIEMSI

Metodo barvanja po Giemsi uporabljamo za barvanje leptospir in virusov, predvsem pa za barvanje krvnih razmazov, kadar želimo prikazati fino strukturo celic in parazitov (npr. parazitov malarije).

**R e a g e n t i :**

1. Standardna raztopina po Giemsi

Azur II — eozin 3 g

Azur II 0,8 g

Glicerol (spec. f. 1,26) 250 ml

Metanol 250 ml

Raztopino topimo v glicerolu pri 60° C. Dodamo metanol in pustimo stati 24 ur. Filtriramo in hranimo v temni steklenici.

2. Fosfatni pufer pH 7,0—7,2

Zmešamo 73 ml 1/15 molarne raztopine sekundarnega natrijevega fosfata in 27 ml 1/15 molarne raztopine primarnega kalijevega fosfata.

1/15 molarni  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  : 11,87 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 1000 ml.

1/15 molarni  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 9,08 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 1000 ml.

**P o s t o p e k :**

V metanolu fiksiran razmaz biološkega materiala barvamo 15—30 minut z razredčeno raztopino po Giemsi (1 kaplja standardne raztopine po Giemsi na 1 ml fosfatnega pufra).

**R e z u l t a t :**

Kromatinska zrna se obarvajo višnjevo rdeče, citoplazma pa modro.

(Se nadaljuje)