

Можливості морфологічної ідентифікації та технологічні особливості гістохімічного методу виявлення грибів у практиці гістолога¹

Мельник О. О., Ліскіна І. В., Мельник О. Л.

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського

Національної академії медичних наук України»

oleksynskaya@ifp.kiev.ua; olday87@gmail.com

Ключові слова: *грибкова інфекція, морфологічна діагностика, метод Гоморі – Грокота, технологія.*

В останні роки набуло значної актуальності вивчення опортуністичних мікозів, які є частими ускладненнями багатьох захворювань, що належать до компетенції лікарів різного фаху. Неспецифічність клінічних проявів інфекції вимагає застосування у клінічній практиці широкого спектру діагностичних досліджень, зокрема й морфологічного. У науковій літературі замало публікацій, які присвячені поясненню технологічних особливостей гістохімічних методів для морфологічного дослідження грибів у тканинах макроорганізму, а саме особливостей, недоліків і нюансів окремих етапів виконання спеціального забарвлення, а також адекватній інтерпретації мікроскопічних знахідок, які можуть спостерігатися в забарвленій тканині.

У статті наведені загальні дані щодо будови грибів і можливостей їх морфологічного виявлення та ідентифікації. Представлено власний досвід застосування найбільш поширеного спеціального гістологічного методу Гоморі – Грокота для морфологічної ідентифікації грибкової інфекції. Детально описані особливості технологічного процесу та наведено власні напрацювання щодо його оптимізації, які не впливають на якість спеціального забарвлення гістологічних зрізів або навіть покращують її. Описано методологічні підходи до гістологічного аналізу отриманих зразків тканини людини та можливості й обмеження гістологічної діагностики різних грибкових інфекцій. Зазначені деталі гістологічної картини, які варто розцінювати як артефіціальні зміни забарвлення тканини. Продемонстровано власні випадки застосування методу Гоморі – Грокота у клінічній практиці, які дали змогу об'єктивно встановити саме грибкову природу патологічних змін уражених органів грудної порожнини. Окреслено перспективи подальшого вдосконалення гістологічної діагностики грибкових інфекцій людини. Зокрема, пропонується паралельне застосування декількох спеціальних методів забарвлення зразків тканини для розширення можливостей виявлення структур гриба в разі їх наявності.

¹ Дослідження виконано в межах науково-дослідницької роботи «Розробити алгоритм гістологічної діагностики патології легень у хворих на ВІЛ-інфекцію» (номер державної реєстрації 0118U007361). Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані із цим рукописом, на момент публікації немає та не передбачається.

Possibilities of morphological identification and technological features of histochemical method of fungi detection in histologist's practice

Melnik O. A., Liskina I. V., Melnik A. L.

State organization "National Institute of Phthiology and Pulmonology named after F. H. Yanovskyi National Academy of Medical Sciences of Ukraine"

oleksynskaya@ifp.kiev.ua; olday87@gmail.com

Key words: medicinal leech, fertility, epididymis, sperm, ejaculate.

In recent years opportunistic mycoses, which are frequent complications of many diseases have become immensely relevant, and it's within the competence of physicians of various specialties. Nonspecific clinical manifestation of infection requires the use of a wide range of diagnostic studies, including morphological in clinical practice. There are not enough publications that explain the technological features of histochemical methods for morphological study of fungi in the tissues of the macroorganism, namely feature, shortcomings and nuances of separate stages in the performance of special staining; adequate interpretation of microscopic findings present in the stained tissue.

The article presents general data on the structure of fungi and the possibility of their morphological detection and identification. Our own experience of using the most common special histological Gomori – Grocott's method for morphological identification of fungal infection is presented. The peculiarities of the technological process are described in detail and our own developments on its optimization are noted, which do not affect or even improve the quality of special staining of histological sections. Methodological approaches of histological analysis of the received samples of human tissue, possibilities and limitations of histological diagnosis of various fungal infections are defined. Besides, the details of the histological picture, which should be regarded as artificial changes in tissue color, are mentioned. Our own cases of application of Gomori – Grocott's method in clinical practice have been demonstrated, which made it possible to objectively establish the fungal nature of pathological changes in the affected organs of the thoracic cavity. Prospects of further improvement in histological diagnostics of human fungal infections are outlined, in particular it is suggested to use several special methods of staining tissue samples simultaneously to expand the possibilities of detecting fungal structures in cases if their presence.

Вступ

Грибкові інфекції (мікози) – одна з найбільш гострих проблем сучасної медицини. Зусилля багатьох спеціалістів спрямовуються на розроблення та впровадження заходів і засобів боротьби з ними. В усьому світі вагомому значення надають розробленню нових протигрибкових препаратів і схем лікування.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, кожен п'ятий житель Землі інфікований грибами, а кожен десятий має клінічні прояви інфекції. Питання про збудників мікозів ускладнюється також тим, що низка захворювань, які клінічно дуже подібні до грибкових, насправді спричиняються інфекційними агентами інших таксономічних груп.

Гриби – це еукаріотичні хемоорганотрофні мікроорганізми з вираженою клітинною стінкою

(оболонкою) товщиною близько 0,2 мкм та цитоплазми з мембранними структурами^{1,2}.

Клітинна оболонка визначає природну стійкість форми гриба, оскільки є щільною пружною полімерною структурою, що виконує опорно-механічну функцію, захищає клітини від впливу зовнішніх факторів, має вибіркочувальну проникність для речовин різної хімічної природи. Клітинна стінка у грибів на 80–90% складається з полісахаридів (манани, глюкози, целюлози), азотовмісних (хітин) і безазотистих сполук. У клітинній стінці також містяться білки, ліпіди, поліфосфати, нуклеїнові кислоти. Зовнішні шари оболонки часто містять пігменти, які надають клітинам різного забарвлення².

Воротами грибкової інфекції в людини найчастіше бувають шкірні покриви та органи дихання^{3–10}.

У діагностиці мікозів застосовуються мікроскопічні (зокрема, гістологічні), мікро-

біологічні (культуральні), імунологічні, серологічні, експериментальні, молекулярно-генетичні та інші методи дослідження.

Дотепер застосування мікробіологічного культурального методу для виявлення конкретних патогенів залишається найбільш ефективним, хоча грибові організми можуть рости тижнями, якщо взагалі виростуть. Відповідно, досить часто грибові інфекції діагностуються за допомогою звичайного патогістологічного дослідження зразків тканини, яке займає від 24 до 48 годин за максимального пришвидшеного процесу.

Найпоширенішим під час патогістологічного дослідження є виявлення структур гриба у зрізах тканин за традиційного гістологічного забарвлення (гематоксилін-еозин). У лабораторній практиці, якщо виникає підозра на грибову інфекцію, проте мікроорганізми або не ідентифікуються, або погано візуалізуються за традиційного забарвлення ураженої тканини, часто використовують додаткові специфічні барвники^{6,11,12}, зокрема найбільш поширені метамін срібла за Гоморі (Methenamine silver plating kit acc. to Gomori та Modified Grocott's methenamine silver stain, далі – GMS) та/або періодична кислота Шиффа (PAS staining kit та Alcian blue-PAS staining, далі – PAS), які застосовуються для того, щоб виключити грибову інфекцію або, навпаки, визначити її наявність і рід гриба за морфологічними характеристиками¹³. Є й інші гістологічні методи забарвлення грибів¹⁴. Фарбування за цими методиками забезпечує більший і кращий контраст, виокремлюючи клітинну стінку гриба, однак потрібно пам'ятати, що під час використання цих методів часто має місце також помилкова ідентифікація, можна отримати несправжньо позитивні та несправжньо негативні результати.

Патогістологічне дослідження корисне для диференціації грибової колонізації та інфекції шляхом ідентифікації процесу проникнення чи запалення у тканині, проте встановлення роду та виду гриба є досить обмеженим¹⁵.

У науковій літературі замало публікацій, які присвячені аналізу технологічних особливостей вищезгаданих методів для гістохімічного виявлення грибів у тканинах макроорганізму, а саме особливостей, недоліків і нюансів окремих етапів у виконанні спеціального забарвлення. До того ж не досить уваги приділяється власне ретельному аналізу тканинних зрізів, забарвлених із метою виявлення структур гриба.

Метою роботи є оптимізація методу Гоморі – Грокота та висвітлення особливостей аналізу гістологічних препаратів за морфологічної ідентифікації структур гриба в різних тканинах людини.

Матеріали та методи досліджень

У роботі застосовано промисловий набір реактивів для методу Гоморі – Грокота виробництва

Thermo Fisher Scientific (США). Перевагою набору є те, що всі його компоненти мають точні концентрації, що підтверджено сертифікатом якості, і досить тривалий термін використання – 1–2 роки. Набір містить детальну покрокову інструкцію виробника щодо проведення забарвлення тканини з парафінових блоків.

У роботі використовувалися парафінові блоки, які отримували з використанням гістоцентру Shandon Histocentre 3 фірми Thermo Scientific (Англія) та парафіну Paraffin Type 6 фірми Thermo Scientific. Парафін такого типу є універсальним для проводки зразків та забезпечує максимальне просякнення досліджуваної тканини для отримання тонких якісних її зрізів.

Гістологічні зрізи тканини, яка має досліджуватися, отримували з парафінових блоків із застосуванням точного ротаційного мікротома Shandon Finesse 325 фірми Thermo Scientific (Англія).

У процесі проведення забарвлення застосовували термостати виробництва Чехії Incucell 111 з температурами 37°C та 58°C.

З огляду на фтизіопульмонологічну спеціалізацію нашої установи тканини людини, які досліджували на можливу наявність грибової інфекції, включали переважно легеневу тканину, лімфатичні вузли та інколи біопсії шкіри. Легеневу тканину отримували під час оперативних втручань різного обсягу, лімфатичні вузли – під час ексцизійної біопсії за різних периферичних локалізацій.

Оскільки в роботі об'єктом дослідження слугував біопсійний та/або операційний матеріал хворих із захворюваннями органів грудної порожнини, то документи «Інформація для учасника досліджень», «Інформована згода пацієнта на медичне втручання», «Інформована добровільна згода пацієнта на проведення діагностики, лікування та на проведення операції та знеболення», «Форма інформованої згоди пацієнта на участь у наукових дослідженнях відповідно до протоколу» додатково не застосовувалися відповідно до протоколу № 1/2016 висновку комітету з медичної етики. Зазначені документи оформлювалися у стаціонарі лікуючими лікарями в історії хвороби.

Модифікація методу та обговорення результатів

Представляємо опис технологічного процесу методики «Modified Grocott's methenamine silver stain», яка поширена в усьому світі для ідентифікації грибових структур із низкою власних раціоналізаторських процедур. Поетапно представляємо її особливості та нюанси, з якими можуть стикатися на практиці лаборанти й лікарі-патологи та які були з'ясовані на нашому власному досвіді.

Будь-яке забарвлення тканини для гістологічного дослідження включає три основні етапи (технології): підготовчий, власне фарбування та завершальний етап.

Згідно з наданим виробником протоколом процедури забарвлення найбільш придатними для виявлення грибів за GMS є зрізи тканини товщиною 4–6 мкм, у практичній діяльності ми виготовляємо зрізи тканини товщиною 5 мкм, якої цілком досить для чіткого виявлення грибів у зрізах тканини за їх наявності.

Підготовчий етап складається з двох процедур: депарафінування та регідратації тканинного зрізу. Перед тим як розпочати підготовчий етап, препарати (скельця зі зрізами) поміщають у термостат із температурою 37°C приблизно на 60 хвилин, щоб покращити процес власне депарафінації. Оскільки більшість барвників не проникають у зрізи, просякнуті парафіном, і є водо- чи спирто-розчинними речовинами, парафін перед фарбуванням препаратів має бути видалений. Згідно з рекомендаціями посібників із гістологічної техніки депарафінацію необхідно проводити у двох ємностях із розчинником (ксилол або толуол) упродовж 3–5 хвилин, цього часу повинно вистачити для розчинення та видалення парафіну, що міститься у зрізі тканини^{15,16}. Однак, як свідчить наш досвід, процес депарафінації бажано проводити більше часу, тому гістологічні препарати поміщають в одну ємність із розчинником приблизно на 50 хвилин. Цього терміну досить, щоб повністю видалити весь парафін із тканини, що сприяє надалі якісному її фарбуванню основними барвниками. Далі препарати підсушують фільтрувальним папером, після чого вони підлягають регідратації у спирті (96%) упродовж 5 хвилин та розміщуються в ємності з дистильованою водою на 5 хвилин.

Як було зазначено, останнім часом для виявлення патогенних грибів у гістологічних препаратах ми використовуємо готовий промисловий набір реактивів для методу Гоморі – Грокота.

Процедура власне фарбування починається з перенесення скелець у ємність із розчином ортоїодної кислоти, при цьому відбувається окиснення полісахаридів до альдегідів. Зазвичай ця процедура триває 5 хвилин, проте якщо є підозра на гістоплазмоз, який необхідно продемонструвати в ураженій тканині, то скельця зі зрізами в розчині ортоїодної кислоти необхідно помістити в термостат із температурою 56–60°C на одну годину (гриби у процесі мікроскопії в цей період набувають чорного забарвлення). Після чого скельця ретельно промивають у 5–6 змінних ємностях дистильованої води. Така особливість технології запропонована виробником промислового набору реактивів для забарвлення GMS. Також варто зауважити, що розчин ортоїодної кислоти потрібно зберігати в холодильнику за температури 2–8°C та періодично повністю міняти; з нашого досвіду можна стверджувати, що однієї робочої порції реактиву вистачає в середньому на

обробку 40–50 скелець, оскільки у процесі його використання втрачається здатність до окиснення полісахаридів.

Наступним кроком є фарбування скелець розчином метаміну срібла, завдяки чому відбувається заміщення в альдегідній групі йонів H^+ йонами Ag^+ , унаслідок чого з'являється золотисто-коричневе забарвлення, яке й дає змогу візуалізувати структуру грибів.

Розчин метаміну срібла завжди готується безпосередньо (*in vitro*) перед тим, як скельця поміщають у ємність із цим розчином. Згідно з прописом для цього необхідно змішати такі реактиви, як метаміну борат (1 капсула з порошком), дистильована вода (50 мл), розчин нітрату срібла (1 мл). Проте зазвичай проводиться фарбування не більше 5–8 зрізів тканини, тому такий об'єм розчину завеликий. Через це для раціонального використання дороговартісних реактивів вирішено готувати у 5 разів менший об'єм розчину, для чого капсулу з порошком метаміну борату розважують на 5 порцій, які зберігаються в епендорфах у звичайному холодильнику та цілком підходять для подальшого використання. Наш досвід свідчить про те, що в разі ретельного проведення цих дій не спотворюються кінцеві результати забарвлення структури зрізу тканини.

Негайно після приготування розчину метаміну срібла в нього занурюють скельця зі зрізами тканини та переносять у водяну баню або мікрохвильову піч із температурою 56–60°C згідно з прописом методики. У наших умовах проводиться розміщення скелець зі зрізами в чашки Петрі, які попередньо, за 30 хвилин, для нагрівання поміщають у термостат із температурою 56–60°C (на дно чашки кладуть фільтрувальний папір та наливають зовсім трохи дистильованої води для створення «ефекту бані», а також підкладають скляні палички, щоб скельця не контактували з водою безпосередньо) на 50 хвилин. У прописі методики зазначено, що після 30 хвилин перебування скелець у термостаті інтенсивність їх фарбування потрібно перевіряти мікроскопічно (чи набули гриби забарвлення від темно-коричневого до чорного), помістивши скельця у стакан із дистильованою водою (вода має бути гарячою, тобто тієї ж температури, що й скельця), який паралельно також ставлять у термостат разом із чашками Петрі. Після мікроскопічної перевірки скельця повертають назад до робочого розчину в термостат і продовжують контролювати кожні 5 хвилин, доки не з'явиться золотисто-коричневий колір і мікроорганізми будуть чітко визначатися. Наш досвід застосування цієї методики дав змогу дійти висновку, що 50 хвилин досить для того, щоб гриби, якщо вони наявні у зрізах тканини, проявилися у процесі фарбування. Після

цього скельця зі зрізами ретельно промивають у дистильованій воді 3–5 разів.

Далі скельця поміщають у ємність із розчином хлориду золота на 30 секунд, де, власне, і відбувається заміщення йонів Ag^+ йонами Au^+ у низці гістологічних структур тканини, через що загальне забарвлення тканини змінюється із золотисто-коричневого на блідо-сіре. Розчин хлориду золота також потрібно зберігати в холодильнику за температури 2–8°C та періодично змінювати (як свідчить наш досвід, через 40–50 скелець у середньому), оскільки у процесі реакцій обміну йони Au^+ з розчину хлориду золота із часом повністю заміщаються йонами Ag^+ . Після цього скельця поміщають у дистильовану воду на 1 хвилину.

Наступний крок – перенесення скелець у розчин тіосульфату натрію на 1 хвилину, який видаляє невідновлене срібло з тканини, утворюючи комплексну сполуку. Цей розчин також необхідно зберігати в холодильнику за температури 2–8°C та періодично повністю замінювати, у середньому через 40–50 скелець, оскільки під дією світла ця сіль частково розкладається. Далі скельця поміщають у дистильовану воду на 1 хвилину.

Останнім кроком є фарбування скелець у розчин барвника «Fast Green» упродовж 30 секунд, що зумовлює появу світло-зеленого фонового забарвлення тканини, яке посилює контрастність препарату та тим самим ще більше визначає позитивне фарбування мікроорганізмів. Зберігати цей розчин також необхідно в холодильнику за температури 2–8°C, проте повністю змінювати його потрібно дуже рідко, оскільки розчин «Fast Green» можна періодично фільтрувати (через 40–50 скелець) і використовувати знову. Після цього скельця ретельно промивають у дистильованій воді.

Завершальний етап включає в себе дегідратацію пофарбованих зрізів у 96% спиртах двічі по 2 хвилини та їх просвітлення в розчиннику (толуол або ксилол) двічі по 2 хвилини. Після цього скельця готові для нанесення фіксуючого бальзаму на зріз тканини та покриття зверху покривним скельцем. Гістологічні бальзами мають консервуючі властивості, що забезпечує можливість тривалого зберігання (не менше декількох років) забарвлених скелець без втрати специфічних кольорів зрізу тканини. Після цього бажано поміщати препарати під наважку (вона поміщається прямо на покривне скельце) на пів години або більше з метою видалення можливих наявних мікропухирців повітря з бальзаму.

Препарат готовий до мікроскопічного дослідження, тобто для гістологічної діагностики патологічного процесу, який представлено у зрізі тканини.

Завдяки особливостям будови клітинної оболонки гриба, яка містить «аргент-афінні структури» («argent-affine structures»), що здатні відновлюватися йонами срібла, які містяться у відповідній солі аргентуму, та утворювати металічне срібло, можна візуально досліджувати й ідентифікувати основні види патогенних грибів.

Подальший етап роботи є аналітичним і включає власне мікроскопічне дослідження забарвленого зрізу ураженої тканини з метою встановлення наявності чи відсутності грибкової інфекції. Як власний досвід, так і опубліковані дані, на жаль, нечисленних джерел літератури^{17,18} свідчать про можливі труднощі інтерпретації мікроскопічної картини навіть у досвідчених лікарів-патологів. Питання правильного розуміння гістологічної картини можуть бути пов'язані як з артефактами у процесі отримання матеріалу для морфологічного дослідження та наступних технологічних процесах (фіксації матеріалу, проводки та заливки шматочків у гістологічні блоки тощо), так і з індивідуальними анатомічними й фізіологічними особливостями організму людини, будовою окремих органів і систем та можливою наявністю прихованого перебігу недиагностованих патологічних процесів.

Наприклад, можна зазначити, що низка тканин та органів (шкіра, легені, судини, нервова тканина) у нормі виявляють виразну аргірофілію. Зокрема, у шкірі та легеневій паренхімі, які частіше бувають об'єктами нашого дослідження, у складі сполучнотканинного каркасу та в судинній сітці наявна дуже значна кількість еластичних волокон. Останні є типовими гістологічними структурами, спорідненими зі сріблом, та за умови відповідної обробки можуть набувати забарвлення, подібного до структур гриба.

Такі обставини для більш правильного й реалістичного виявлення мікроміцетів вимагають спостерігати та ідентифікувати останні в ділянках тканини з некрозом-некробіозом, тобто з максимальною відсутністю збережених тканинних структур. Встановлено, що досить часто фонового забарвлення набуває також вміст ядер клітин тканини, яка досліджується. Знов-таки, саме в ділянках тканини, які піддалися руйнуванню, такі артефакти практично відсутні або представлені мінімально. У деяких випадках досить складно диференціювати забарвлені фрагменти клітин ураженої тканини (клітинний детрит та спори грибів).

Отже, щоб отримати правильний патологістологічний висновок щодо патологічного процесу, варто намагатися досліджувати ділянки зрізу тканини з деструкцією у вигляді некрозу-некробіозу та саме в них виявляти структури грибів. Про такий підхід опосередковано свід-

чать і численні мікрофотографії у відповідних за тематикою наукових статтях^{13,14,19}.

Загалом наш досвід застосування вищеписаного методу Гоморі – Грокота з метою виявлення грибкових структур у різних тканинах людини становить дослідження 215 випадків із підозрою на грибкову інфекцію за останні 3 роки.

Окремі приклади з нашої практики застосування методу для ідентифікації грибкової інфекції з мікрофотографіями гістологічних препаратів наведено на рис. 1 та 2. Виявлені структури грибів мали принципове значення для встановлення патологогістологічного висновку та, відповідно, клінічного діагнозу захворювання.

На рис. 1 представлено ділянку некробіозу легеневої паренхіми, у якій виявляються численні дрібні округлі та овальні структури гриба, забарвлені в чорний колір, за морфологією, найбільш імовірно, – гістоплазми (чорні стрілки). Також у тканині наявні структури збережених фрагментів еластичного каркасу судин та інтерстицію легеневої паренхіми (ближче до краю рисунку, окрім верху), які набули коричнево-чорного забарвлення. Результат застосування модифікованого варіанта методу Гоморі – Грокота на виявлення гістоплазми підтвердив попередній висновок щодо роду гриба.

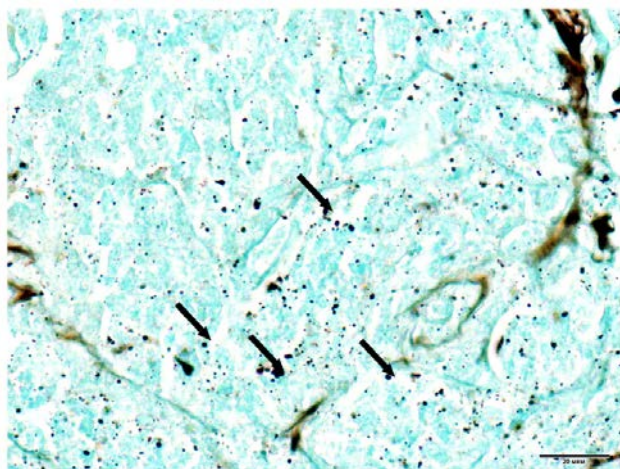


Рис. 1. Грибкове ураження легень дріжджоподібними грибами. Забарвлення за Гоморі – Грокотом. Збільшення x400

На рис. 2 в центральній частині визначається велика ділянка некротизованої легеневої тканини, у якій присутня помірна кількість досить крупних сферул мікроміцету (окремі структури гриба вказані темними стрілками). Така морфологія гриба є типовою для кокцидіомікозу (діагноз було підтверджено мікробіологічним дослідженням). Також спостерігаються частково забарвлені залишкові структури еластичних волокон (білі стрілки).

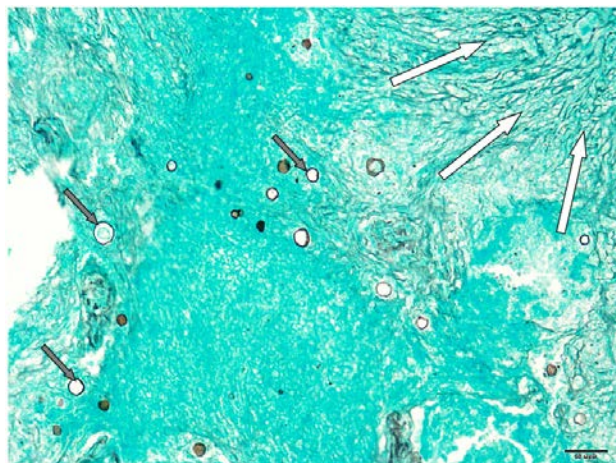


Рис. 2. Кокцидіомікоз легень. Забарвлення за Гоморі – Грокотом. Збільшення x400

Патогенні для людини мікроскопічні гриби належать до зигоміцетів, аскоміцетів, дейтеро-міцетів.

У разі виявлення структур грибів під час гістологічного дослідження в ураженій тканині насамперед можна визначити групову належність грибів: гіфові (міцелярні) або дріжджоподібні (кокові). Серед міцелярних грибів з огляду на особливості морфології мікроміцетів та за наявності певного практичного досвіду можна досить точно диференціювати аспергіли з мукором (за товщиною та розгалуженням гіфів). Досить рідко в царині фтизіатрії та пульмонології трапляються актиноміцети (за таксономічною класифікацією вони належать до бактерій), проте вони також мають своєрідну морфологію та забарвлюються у процесі застосування методу Гоморі – Грокота, що дає змогу визначити їх у тканині під час гістологічного дослідження.

До поширених грибкових інфекцій людини відносять кандиди та гістоплазму. Досить непросто за гістологічним дослідженням диференціювати саме кандиди та гістоплазмоз, навіть за умови спеціального забарвлення. Їхні розміри й форма часто близькі до ядер клітин ураженої тканини, часточок пилу, обривків волокнистих структур тканини, що може спричинити помилки діагностики. За імунодефіцитних станів у вражених тканинах можна виявити структури аспергіл, криптококи, пневмоцисти тощо.

У таблиці 1, яка представлена в роботі J. Guarner¹⁴, узагальнені сучасні різні барвники та альтернативні методи фарбування грибів у тканинах. Ми процитуємо її у спрощеному вигляді. Зрозуміло, що жоден із представлених методів не є досконалим, практично жодний із них не здатний забарвлювати всі без винятку види грибів. Зокрема, використання GMS може призвести до поганого фарбування під час фрагментації або

некрозу грибкових елементів¹⁴. Ще одним обмеженням є те, що забарвлення за GMS близьке до природного кольору цвілі, а тому ускладнює ідентифікацію гіалінових організмів із мертвих рослин та не дає можливості в деяких випадках правильно інтерпретувати результати фарбування²⁰. Під час використання PAS структурні елементи фонові тканини також можуть забарвлюватися одночасно з клітинною стінкою гриба^{8,14}.

Поширеність грибкових інфекцій, їх видова різноманітність, здатність до вкрай поліморфних варіантів уражень людини як щодо органів та систем організму, так і за ступенем важкості клінічної картини зумовлюють постійну увагу медичної спільноти до цієї проблеми. Неспецифічність клінічних

проявів інфекції вимагає застосування у клінічній практиці широкого спектру діагностичних досліджень, зокрема морфологічного. Представлений власний досвід гістологічної ідентифікації грибів в уражених тканинах може слугувати прикладом успішного застосування методу Гоморі – Грокота для потреб практичної медицини.

Висновки

1. Представлено власний досвід застосування найбільш поширеного спеціального гістологічного методу Гоморі – Грокота для морфологічної ідентифікації грибкової інфекції. Відмічено особливості технологічного процесу, зокрема: а) оптимальна товщина зрізів тканини для чіткого вияв-

Таблиця 1 – Барвники та альтернативні методи фарбування грибів у тканинах (цитуються за J. Guarner¹⁴)

Барвники (методи фарбування)	Особливості результату застосування	Результати фарбування
1. Гематоксилін та еозин (ГЕ)	Барвники дають змогу ідентифікувати запальну реакцію макроорганізму, а саме багатоядерні гігантські клітини, некротичний матеріал, крововиливи та феномен Splendore-Höerpli. Із цими барвниками можна виявити більшість грибів, особливо ядра дріжджоподібних грибів або якщо грибок природно пігментований (проте елементи грибів може бути важко відрізнити від фонового фарбування)	Усі гриби демонструють рожеву цитоплазму, сині ядра та безбарвні оболонки
2. Барвник срібла (метамін срібла Грокота та Гоморі (GMS))	Стінка гриба виділяється за рахунок витіснення альдегідної групи сріблом	Стінка гриба забарвлюється в чорний або темно-коричневий колір для всіх грибів, фонові тканини зазвичай має зелений колір, слизова оболонка може фарбуватися дуже слабо
3. Періодична кислота Шиффа (PAS)	Виявляє глікоген у тканинах, оскільки стінки грибів містять велику кількість глікогену	Клітинна стінка грибів набуває забарвлення від рожевого до червоно-пурпурового залежно від використаного контрастного барвника, ядра можуть бути синіми
4. Метод Грідлі	Фарбує стінки більшості грибів	Клітинна стінка грибів набуває пурпурово-червоного кольору, фон зазвичай має жовтий колір
5. Барвник муцину (муцикармін Майєра або Саутгейта, альціановий синій)	Виявляє мукополісахариди, зокрема в капсулі різних організмів, а також фарбує слиз у клітинах макроорганізму	Фарбує капсули криптококів, які набувають червоного чи синього кольору
6. Барвник меланіну (Фонтана-Массон)	Забарвлює меланін, який присутній у деяких грибів; також фарбує меланін, який присутній у тканинах людини, наприклад епідермісі шкіри	Криптококи та група дематіасових* грибів набувають забарвлення від чорного до темно-коричневого
7. Бактеріальний барвник (фарбування тканин по Граму або кислотостійкі барвники)	Деякі гриби забарвлюються бактеріальним барвником, крім того, деякі нитчасті бактерії (актиноміцети та нокардії) необхідно диференціювати від грибів	Кандиди набувають пурпурного / синього (грампозитивні) забарвлення по Граму; бластоміцети та гістоплазма можуть бути кислотостійкими (набувають червоного забарвлення)

Примітка: * – дематіасові гриби (“*dematiaceous or phaeoid moulds*”) – це гетерогенна група організмів, що включає в себе гіфоміцети, целоміцети та аскоміцети. Спільною ознакою цих грибів є наявність темної пігментації, що зумовлена наявністю в їхній клітинній стінці дегідроксинафталін меланіну^{9,21}

лення структур гриба становить 5 мкм; б) процес депарафінізації рекомендовано проводити більше часу, приблизно 50 хвилин; в) оптимальна заміна робочих розчинів реактивів, які використовуються для однієї партії забарвлення, у середньому після обробки 40–50 скелець; г) додатковий розподіл готового реактиву, який надається у вигляді порошку, з метою його раціонального використання.

2. Завдяки технологічним особливостям набору реактивів виробництва Thermo Fisher Scientific (США), що застосовується, є можливість ідентифікувати гриби *Histoplasma* spp.

3. Окреслено можливості діагностики на гістологічному рівні різних грибкових інфекцій за власним досвідом, можливі артефакти методу, що

проілюстровано мікрофотографіями забарвлених структур грибів.

Перспективними питаннями в цьому напрямі морфологічної діагностики можна вважати застосування низки методик для виявлення грибкової інфекції та їх раціональне поєднання, що дасть змогу більш точно визначати грибкову інфекцію на рівні роду гриба та сприятиме більш адекватному вибору терапії. Однак варто пам'ятати, що найбільш точним методом встановлення виду грибкової інфекції залишається мікробіологічне культуральне дослідження, тому за можливості необхідно проводити паралельні морфологічні та мікробіологічні дослідження ураженої тканини.

Література

- (1) Мінухін, В.В.; Замазій, Т.М.; Коваленко, Н.І. (ред.). Патогенні гриби. Методичні вказівки з дисципліни «Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою» для студентів-бакалаврів II–IV курсу за спеціальністю «Лабораторна діагностика». Харків: ХНМУ; 2016. 76 с.
- (2) Чорна, Т.М. Мікробіологія. Ірпінь: УДФСУ; 2020. 412 с.
- (3) Максимова, П.Е.; Купша, Е.И. Гистология микозов, обусловленных дерматофитами. *Международный студенческий научный вестник*. 2018; 6: 1–6.
- (4) Самсонова, М.В.; Черняев, А.Л.; Лебедин, Ю.С.; Михайличенко, К.Ю.; Поливанова, А.Э. Мукормикоз легких. *Пульмонология*. 2018; 28(2): 243–247. DOI: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2018-28-2-243-247>.
- (5) Резніченко, Н.Ю.; Алдошина, А.О. Оптимізація лікування мікозів шкіри з використанням антимікотичу зовнішньої дії. *Дерматовенерология. Косметология. Сексопатология*. 2018; 1-4: 161–165.
- (6) Шкарин, В.В.; Саперкин, Н.В. Эпидемиология оппортунистических микозов. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2017; 3: 21–31.
- (7) Adamczyk, K.; Garnarczyk, A.A.; Antonczak, P.P. The microbiome of the skin. *Dermatol Rev*. 2018; 105: 285–297. DOI: <https://doi.org/10.5114/dr.2018.75584>.
- (8) Anthony, P.P. A guide to the histological identification of fungi in tissues. *J. Clin. Path.* 1973; 26: 828–831.
- (9) Santos, A.L.S., Palmeira, V.F., Rozental, S., Kneipp, L.F., Nimrichter, L., Alviano, D.S. et al. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol Rev*. 2007; 31: 570–591. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00077.x>.
- (10) Li, Z., Lu, G., Meng, G. Pathogenic fungal infection in the lung. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 1–20. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01524>.
- (11) Константинова, А.М. Криптококкоз при ВИЧ-инфекции. *Вестник Санкт-Петербургского университета*. 2010; 11(3): 37–44.
- (12) Чарушина, И.П. Оппортунистические инвазивные микозы у ВИЧ-инфицированных пациентов. *Пермский медицинский журнал*. 2015; XXXII(1): 71–77.
- (13) Heaton, S.M.; Weintrob, A.C.; Downing, K.; Keenan, B.; Aggarwal, D.; Shaikh, F. et al. Histopathological techniques for the diagnosis of combat-related invasive fungal wound infections. *BMC Clinical Pathology*. 2016; 16(11): 1–9. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12907-016-0033-9>.
- (14) Guarner, J.; Brandt, M.E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clinical microbiology reviews*. 2011; 24(2): 247–280. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-10>.
- (15) Волкова, О.В.; Елецкий, Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. Москва: Медицина; 1971. 272 с.
- (16) Коржевский, Д.Э.; Гиляров, А.В. Основы гистологической техники. Санкт-Петербург: СпецЛит; 2010. 95 с.
- (17) Войно-Ясенецкий, М.В.; Жаботинский, Ю.М. Источники ошибок при морфологических исследованиях. Ленинград: Медицина; 1970. 319 с.
- (18) Фирстова, О.И.; Бадяева, Е.Е. Основные источники ошибок при морфологических исследованиях. *Избранные вопросы судебно-медицинской экспертизы*. 2008; 9: 117–120.

- (19) Sangoi, A.R.; Rogers, W.M.; Longacre, T.A.; Montoya, J.G.; Baron, E.J.; Banaei, N. Challenges and pitfalls of morphologic identification of fungal infections in histologic and cytologic specimens. *Am J Clin Pathol.* 2009; 131: 364–375. DOI: <https://doi.org/10.1309/AJCP99000ZSNISCZ>.
- (20) Hofman, V.; Castillo, L.; Betis, F.; Guevara, N.; Gari-Toussaint, M.; Hofman, P. Usefulness of frozen section in rhinocerebral mucormycosis diagnosis and management. *Pathology.* 2003; 35(3): 212–216. DOI: <https://doi.org/10.1080/0031302031000123173>.
- (21) Anaissie, E.J.; Pfaller, M.A.; McGinnis, M.R. (eds.). *Clinical Mycology.* Edinburgh, Scotland: Elsevier Inc; 2009: 329–354.