

PREPARAT PRZYŻYCIOWY BARWIONY TUSZEM CHIŃSKIM

PRZEZNACZENIE

Stosuje się w celu zwiększenia mikroskopowego wykrywania grzybów z rodzaju *Cryptococcus* w preparatach mokrych.

STRESZCZENIE I OBJAŚNIENIE

Tusz chiński umożliwia uwidocznienie polisacharydowej otoczki grzybów z rodzaju *Cryptococcus*. Materiał tworzący otoczkę *Cryptococcus* wypiera cząsteczki węgla koloidowego tuszu w taki sposób, że otoczka wygląda jak wyraźne przejaśnienie dookoła drobnoustrojów na czarnym tle.¹

Tusz chiński można stosować do barwienia ropy, wysięku, tkanki, płwociny, osadu odwirowanego moczu oraz preparatów płynu mózgowo-rdzeniowego.² Rozmaz z użyciem tuszu chińskiego jest szczególnie użyteczny w przypadku preparatów płynu mózgowo-rdzeniowego, ponieważ *Cryptococcus neoformans* jest najczęstszą na świecie przyczyną grzybiczych zakażeń ośrodkowego układu nerwowego.³ Wygląd drożdżakowych postaci grzybów tworzących otoczkę w rozmazie płynu mózgowo-rdzeniowego zabarwionego tuszem chińskim jest diagnostyczny, umożliwiając rozpoznanie kryptokokowego zapalenia opon.⁴

ZASADY PROCEDURY

Barwienie z użyciem tuszu chińskiego jest barwieniem negatywnym, w wyniku którego otrzymujemy ciemne tło i niewybarwione drobnoustroje. Grzyby z rodzaju *Cryptococcus* są kulistymi (czasami owalnymi) postaciami drożdżaków, których średnica waha się od 4 do 20 μm . Polisacharydowa otoczka kryptokoków występuje u prawie wszystkich przedstawicieli rodzaju *Cryptococcus* i jest oporna na barwienie tuszem chińskim.

Należy przestrzegać odpowiednich procedur laboratoryjnych dotyczących obchodzenia się z materiałami zakaźnymi oraz ich utylizacji.

Przechowywanie: Przechowywać w kontrolowanej temperaturze pokojowej 15 – 30°C.

PROCEDURA

1. Do niewielkiej ezy jałowej soli fizjologicznej, wody lub bulionu umieszczonych na uprzednio oczyszczonym szkiełku mikroskopowym należy dodać niewielką ilość kolonii z młodej hodowli agarowej lub osad materiału, albo bezpośrednio podać kroplę płynu mózgowo-rdzeniowego na szkiełko.
2. Dodać jedną kroplę tuszu chińskiego i wymieszać.
3. Nakryć dużym szkiełkiem nakrywkowym. Delikatnie docisnąć, aby umożliwić rozprowadzenie płynu w formie cienkiej warstwy pod szkiełkiem nakrywkowym.
4. Obejrzeć szkiełko pod małym powiększeniem i dokładnie obejrzeć pod dużym powiększeniem lub używając obiektywu immersyjnego, szukając otoczkowych postaci drożdżaków.

KONTROLA JAKOŚCI PRZEZ UŻYTKOWNIKA

1. Sprawdzić odczynnik pod kątem oznak pogorszenia jakości.
2. Preparaty szczepów kontroli dodatkowo (trwająca 48 godzin hodowla *Cryptococcus neoformans* ATCC 36556), ujemnej (*Candida albicans* ATCC 10231) i barwnika (1 kropla tuszu chińskiego + jedna kropla jałowej soli fizjologicznej) należy wykonać równocześnie z preparatami badanych drobnoustrojów lub materiałów.

WYNIKI

W rozmazach dodatnich otoczki kryptokoków wyglądają jak przejrzyste, załamujące światło strefy przejaśnień albo wokół komórek drożdżaków, albo rozmieszczone pomiędzy dobrze odgraniczoną ścianą komórkową i otaczającymi czarnymi masami cząsteczek tuszu chińskiego. Otoczki mogą być szerokie lub wąskie. Komórki drożdżaków mogą być okrągłe, owalne lub wydłużone; formy pączkujące mogą być nieobecne, pojedyncze lub, rzadko, liczne. Formy pączkujące mogą być oddzielone od komórki macierzystej, ale zamknięte we wspólnej otoczce.

OGRANICZENIA PROCEDURY

1. Należy zwrócić uwagę, aby błędnie nie uznać kropli tłuszczu lub limfocytów za postacie drożdżaków. Krople tłuszczu nie cechują się obecnością dobrze odgraniczonej ściany komórkowej. Limfocyty charakteryzują się nierównymi granicami i mimośrodkowo położonym jądrem. Otoczka kryptokoków ma zwykle ostro obrysowany kontur, a dobrze odgraniczona ściana komórkowa drożdżaków jest położona centralnie wewnątrz otoczki.³
2. Drobnoustroje u chorych na AIDS mogą nie posiadać otoczek.¹
3. Rozmazy z użyciem tuszu chińskiego wykonane na preparatach z osadu płynu mózgowo-rdzeniowego są dodatnie jedynie w 60% wszystkich przypadków kryptokokowego zapalenia opon.³ Wszystkie próby o wykonanie rozmazów z użyciem tuszu chińskiego należy uzupełnić hodowlą lub badaniami wykrywającymi antygeny.³
4. Grzyby z rodzaju *Rhodotorula* i rzadko *Torulopsis* wytwarzają otoczki.⁴
5. Dodatni rozmaz z użyciem tuszu chińskiego może być wykorzystany jedynie do ustalenia prawdopodobnego rozpoznania. Ostateczne rozpoznanie musi być zakończone hodowlą i/lub badaniami wykrywającymi antygeny.^{1,3}
6. Jeśli rozmaz jest zbyt ciemny, należy rozcieńczyć tusz chiński w proporcji 1:2 jałową, destylowaną wodą lub wykonać nowy rozmaz. Materiałów poddanych działaniu 20% KOH nie można stosować do wykonania preparatów z użyciem tuszu chińskiego.

CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA

Cryptococcus neoformans jest przyczyną zapalenia opon. Szereg badań⁵⁻¹⁰ wskazuje na przydatność barwienia z użyciem tuszu chińskiego jako jednego z narzędzi w rozpoznawaniu *C. neoformans*. Wspomniane artykuły pokazują, że barwienie z użyciem tuszu chińskiego jest użyteczne w identyfikacji *C. neoformans* w próbkach płynu mózgowo-rdzeniowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Baron, E.J., and S.M. Finegold. 1990. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 8th ed. The C.V. Mosby Co., St. Louis.
2. Kwon-Chung, K.J., and J.E. Bennett. 1992. Medical mycology. Lea & Febiger, Philadelphia.
3. Dalton, H.P., and H.C. Nottebart, Jr. 1986. Interpretive medical microbiology. Churchill Livingstone, New York.
4. Balows, A., W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy (ed.). 1991. Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. McGinnis, M.R.: Detection of fungi in cerebrospinal fluid. Am. J. Med.; July 28, 1983: 129-138.
6. Wang, W., and A.R. Carm: Clinical manifestations of AIDS with cryptococcal meningitis. China Med J (Engl); Aug, 2001: 114(8): 841-843.
7. Monaco, L.S., Nieto F. Silva, E. Warley, M.R. Cervelli: AIDS-associated meningeal cryptococcosis in the Hospital Diego Paroissien from 1996-1999. Rev. Argent. Microbiol. (Rev); Apr-June, 2001: 33(2): 118-121.
8. Koneman, E.W.: Should an India Ink test be used to detect cryptococcal meningitis in a lowrisk population – primarily in a general acute care setting – or are better stat tests available? CAP Today; Dec, 2000: 14(12): 62.
9. Imwidthaya, P. and N. Pongvarin: Cryptococcosis in AIDS. Postgrad. Med. J.; Feb, 2000: 76(892): 85-88.
10. Menezes, E.A., M.N. Monteiro, M.R. Angelo, C.D. Santos, C.C. Freire and F.A. Cunha: *Cryptococcus neoformans* causing meningitis in AIDS patients. Rev. Soc. Bras. Med. Trop; Sep-Oct, 2002: 35(5): 537-539.