

Из кафедры Эпизоотологии. Зав. кафедрой доцент Я. Сандомирский.

О НОВОМ МЕТОДЕ Е. В. КОЗЛОВСКОГО ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ОКРАСКИ БРУЦЕЛЛ

Я. Сандомирский и А. Б. Черномордик

Такой ценный метод диагностики, как бактериоскопия, при бруцеллезе до сих пор практического применения не имел, ввиду того, что бруцеллы известными до сих пор дифференциальными методами окраски не окрашиваются положительно (например, по Грамму, Циль-Нельсену, Нейссеру и др.), а „обычными растворами окрашиваются неравномерно и нередко биполярно“ (Михин). Действительно, при окраске даже чистых культур бруцелл обычными спиртоводными или водными анилиновыми красками (карбол-фуксин, синька Леффлера, генциан-виолет и др.), микроскопическая картина ничего характерного не представляет и вследствие частого полиморфизма бруцелл может походить и на кокков и на овоидов и даже на бациллы кишечной группы. Микроскопия патологического материала, секретов и экскретов, выделений из половых путей, содержимого сычуга абортированных плодов, мазков из последов и т. д.—поэтому при обычных методах окраски не дает суждения о наличии или отсутствии в этих материалах бруцелл. С другой стороны, постоянное и обильное присутствие в этих материалах от бруцеллезных животных самих бруцелл, при том в некоторых материалах нередко в чистом виде (содержимое сычуга-плода, эксудат на воспаленных котилидонах последа) при наличии какого-либо метода специальной окраски, (дифференциальной или даже специфической), дало бы в руки как исследователя, так и практического врача быстрый метод хотя бы ориентировочной или предварительной диагностики бруцеллеза путем бактериоскопии. Попыткой такой окраски надо считать метод Турбьерсена: мазки фиксировать 10 минут метиловым спиртом, а затем 15 минут красить по Гимза (30 капель на 10 куб. сантиметров воды), одну секунду дифференцировать в 1% уксусной кислоте, обмыть водой и обсушить (По

пе). Этот метод окраски был одним из нас (Сандомирский) широко проверен в период работы в Бруцеллезной лаборатории ВИЭВ на мазках из содержимого сычугов абортированных плодов кр. рог. скота, при одновременных контрольных посевах из этих сычугов на предмет выделения чистых культур бруцелл. Действительно препараты получались весьма демонстративные: голубые микрококки (бруцеллы) на светло-розовом фоне слизи и в большом числе фагоцитированные в темно-розовой протоплазме лейкоцитов с ярко-фиолетовым ядром; грамположительные бактерии темно-синие. Процент таких положительных микроскопических находок на заведомо патологическом материале, из которого затем получалась чистая культура, равнялся примерно 50-ти. Томсену надежно установить бруцеллез микроскопированием удавалось в 70% случаев. О попытке дифференциальной окраски бруцелл имеется в литературе лишь указание на Шлегеля, который пользовался для контрастной окраски бруцелл 1% раствором метиленблау (1/2 часа) и сильно разведенным раствором фуксина (5 капель на 20 кс воды) в течение 3-х секунд. Но в общем этот вопрос оставался нерешенным и ждущим новых исследований.

При посещении одним из нас в 1935 г. Киевской Военно-Ветеринарной Бактериологической Лаборатории начальник этой лаборатории Ф. О. Посредник и ассистент т. Козловский любезно ознакомили нас с новым методом дифференциальной окраски бруцелл предложенным т. Козловским. Нам была предоставлена возможность ознакомиться, как с рукописью т. Козловского „О тинкториальных свойствах бруцелл“, так и с его методикой. В заключение тт. Посредник и Козловский попросили нас взять на себя проверку этого способа в нашей лаборатории. В основе этого способа лежит „запаздывание в окраске“ бруцелл, при окраске их на холоду слабыми водными растворами некоторых основных анилиновых красок. Непригодны для этой окраски спиртовые или спиртоводные растворы, а также кислые краски.

В основном автор пользуется двумя следующими растворами:

1. 2% водный раствор сафранина;
- 2) 1% раствор малахит-зелени. Высушенный и фиксированный на огне мазок окрашивается с подогреванием до появления первых пузырьков газа раствором № 1. Затем краска основательно смывается холодной проточной водой и препарат докрасывается на холоду раствором № 2 от 1/2 до 2-х минут в зависимости от толщины мазка. В результате этой окраски сафранин окрашивает препарат целиком, малахитовая зелень — избирательно. Бруцелла, как «запаздывающая» в окраске, остается ярко-красного цвета на зеленом фоне клеточных элементов и прочей бактериальной флоры. Мазок должен быть по возможности очень тонким. Действительно, в продемонстрированных нам т. Козлов-

ским препаратами, при нас же окрашенных, имелась вышеизложенная дифференцированная окраска.

Убедившись принципиально в действенности этого нового метода, мы решили его испытать в нашей лаборатории, для чего, однако, возможность (и при том ограниченная) представилась лишь в январе 1936 г. Работа производилась в основном методом «3-х капель» (по терминологии т. Козловского). На предметное стекло наносилась капля чистой культуры бруцеллы в бульоне или из агара на 1 каплю физраствора, на другом конце стекла такая же капля другой сравнимой микробной культуры. В середине предметного стекла между обеими каплями наносилась капля смеси, изготовленной на часовом стеклышке в физрастворе из обеих культур. Все это подсыхало, затем фиксировалось на пламени, а затем красилось по Козловскому и производилась сравнительная микроскопия всех трех окрашенных капель мазков. Результаты этих опытов сведены в таблице (см. 235 стр.).

Из наших опытов следует, что бруцелла безусловно окрашивается по Козловскому положительно („К+“) и стойко сохраняет это свойство в старых и даже погибших культурах. С другой стороны, вегетативные формы испытанных бациллярных и кокковых микробов в свежих культурах (1-3-суточные) красятся по Козловскому отрицательно („К—“) и поэтому в бактериальных смесях бруцелла ярко дифференцирована. Однако, наши опыты показали, что некоторые культуры при старении (6 суток и более) начинают менять свои тинкториальные свойства и что в них отдельные микробы становятся „К+“, что очевидно связано с деструктивными процессами в эктоплазме бактерий, связанные с их постарением или отмиранием. Отсюда следует необходимость, экспериментально проверить, не встречаются ли также „инвиво“ такие состарившиеся микробы или их „трупы“, которые, окрашиваясь „К+“, симулировали бы собою бруцеллы. Затем мы обнаружили, что некоторые спорогенные бациллы в своих споровых формах могут окрашиваться слабо положительно и даже резко положительно по Козловскому (напр. споры бациллы Мегатериум). Это априори надо было ожидать. Споры, благодаря своей плотной оболочке тоже „запаздывают“ в окраске—т. е. дополнительно не окрашиваются. Но у некоторых видов спорогенных микробов (напр. Мегатериум) оболочка споры все-же не слишком резистентна и поэтому прокрашивается при нагревании даже таким слабым для спор красителем, как водный раствор сафранина. Очевидно, что этот вопрос требует дополнительных исследований и уточнений.

Затем нами был бактериоскопически по Козловскому исследован гной от 2-х лошадей, пораженных „хирургическими“ формами бруцеллеза и находившихся в хирургической клинике нашего института: 1) кобыла № 3 колхоза „Новый труд“.

Таблица опытов окраски по Козловскому

№ п/п	Название микроорганизмов	Возраст культур	Результаты окраски по Козловскому
1	Бруцелла абортус бовис	2 дня	плюс
2	" мелитензис	6 мес.	плюс
3	" сунс	6 "	плюс
4	Бациллус пноцианеус	2 дня	минус
5	" " 	4 "	минус
6	" " 	8 мес.	минус
7	Белая обыкнов. плесень	2 дня	минус
8	Трихофитон екви	Старая	минус
9	Кишечная палочка	1 день	минус
10	" " 	6 дней	минус, отдельные плюс
11	Протей	2 дня	минус
12	Паратиф	2 дня	минус
13	Стафилококк кремовый	2 дня	минус
14	" " 	6 дней	минус, отдельные сомнительн.
15	Бациллус микондэс	1 день	минус (спор не заметно)
16	" " 	2 дня	палочки минус, споры розоватые
17	" " 	4 дня	Тоже самое
18	Бациллус мегатериум	1 день	минус (спор не заметно)
19	" " 	2 дня	палочки минус, споры розоватые
20	" " 	4 дня	палочки минус, отдельные споры красные.
21	Бациллус субтилис	1 день	минус (споры незаметные)
22	" " 	2 дня	палочки минус, споры безцветные.
23	" " 	4 дня	отдельные споры розовые.
24	Дрожжи обыкновенные	2 дня	протоплазма минус, зернистые включения плюс.

ПРИМЕЧАНИЕ: Плюс означает окраска в красный цвет, минус в зеленый цвет.

ла, Р. агглютинации 1:800, абортинговая проба положительная. Бактериоскопически: отдельные коккобациллы характерной формы, окрасились по „К+“; 2) кобыла № 25 того же колхоза „нагнет холки“, Р. агглютинации 1:1200, абортинговая проба положительная. Мазки из гноя по „К—“. В одной из лабораторий г. Витебска из обеих проб гноя получены были культуры бруцелл.

На основании наших, далеко недостаточных, провероч-

ных опытов мы приходим к выводу, что: 1) метод Козловского безусловно позволяет дифференциально окрашивать бруцеллы среди многих проверенных микроорганизмов и является ценным вкладом в учение о тинкториальных свойствах бруцелл; 2) этот метод требует дополнительной разработки в отношении старых вегетативных культур, а также спорогенных микробов, где его дифференцирующее значение для нас осталось неубедительным; 3) окончательная апробация практической ценности этого метода может быть дана лишь на основании всесторонней проверки этого метода „инвиво“, т. е. на патологическом материале при сопоставлении его с данными серо-реакций, аллергии, выращивания чистых культур или заражением экспериментальных животных.

ПРИМЕЧАНИЕ: Уже перед самой сдачей в печать настоящей работы мы ознакомились со статьей т. Козловского в журнале „Советская Ветеринария“ № 1 за 1936 г.

Л и т е р а т у р а

- 1) К. П о п е—„Инфекционный аборт“ Handb. d. Pathog. Mier. VI/2—1928 г.
 - 2) Е. К. К о з л о в с к и й—„О тинкториальных свойствах бруцелл“. Рукопись 1935 г.
-

„Über die neue Methode von E. Koslowski einer Differentialfärbung von Brucellen“.

J. Sandomirsky und A. Tschernomordik

Die Autoren kontrollierten die neue Methodik von E. Koslowski (Kieff—Militärveterinärlaboratorium): Färbung der Ausstriche mit einer 2₀/₀ Safranin-Wasser-lösung unter Erwärmung; Abspülen, sodann Nachfärbung mit 1₀/₀ Malachitgrünwasserlösung $\frac{1}{2}$ —2 Minuten. Brucellen—rot; gewebe und andere Keime—grün. Die Autoren kommen zu Schlussfolgerung, dass die neue Methode zweifellos eine Differenzialfärbung der Brucellen gestattet, aber dass nachträgliche Forschungen gegenüber alten vegetativen Kulturen und sporogenen Keimen notwendig sind. Die Approbation dieser Methode für die weite Praktik bedarf einer vorübergehenden, vergleichenden Bewertung mit anderen diagnostischen Methoden (Serologie, Allergie, Kultur und Tierversuch).
