

Люминесцентная микроскопия в диагностике атипичных мико- бактерий туберкулеза птичьего типа

В. М. ЖАВНЕНКО

Существующие методы лабораторной диагностики туберкулеза кур трудны и требуют значительной затраты времени. В литературе имеется ряд сообщений о положительных результатах применения люминесцентной микроскопии для выявления микобактерий туберкулеза (Н. Н. Бобров, 1946, 1949; О. А. Полякова, 1957; Ю. Н. Зубжицкий, 1957). При этом установлено, что люминесцентная микроскопия позволяет выявить микобактерии туберкулеза в исследуемом материале значительно чаще, чем при обычной световой микроскопии с окраской препаратов по способу Циль—Нильсена.

Люминесцентная микроскопия в диагностике туберкулеза осуществляется путем флюорохромирования препаратов-отпечатков или мазков из бактериальных культур по методу Боя—Поляковой. Данный метод позволяет не только изучить морфологию микобактерий, но и значительно повысить процент выявления этих микроорганизмов (*Boy I. and all.*, 1954).

Вместе с тем вопрос о целесообразности применения люминесцентной микроскопии для обнаружения атипичных форм возбудителя туберкулеза изучен недостаточно (Ю. Н. Зубжицкий, 1957). Задача нашей работы состояла в изучении возможности применения люминесцентной микроскопии для выявления атипичных микобактерий птичьего типа.

Материалом для работы послужили 10 штаммов *M. tuberculosis*, которые были выделены при бактериологическом исследовании 35 трупов кур, поступивших из различных хозяйств Витебской области. Культуры выделены и типированы по общепринятой микробиологической методике. Все они оказались типичными по своим

морфологическим, культуральным (микрофото 1), биохимическим свойствам и были вирулентны для кроликов и белых мышей. Одновременно определена их чувствительность к некоторым антибиотикам и установлена высокая чувствительность к стрептомицину (1—2 ед/мл), тетрациклину (4 ед/мл), неомицину (0,8 ед/мл) и левомицетину (4 мкг/мл).



Рис. 1. Типичная культура *M. tuberculosis* (*T. avium*) на среде Петраньяни, 20-е сутки роста.

Определение чувствительности микобактерий к антибиотикам проводили по несколько видоизмененной нами методике В. А. Соловьева (1952). При использовании этой методики мы сочли возможным применить люминесцентную микроскопию. Микобактерии культивировали на глюкозо-картофельном отваре. В пробирках разводили антибиотики (1:100, 1:50, 1:25 и т. д.). После этого в каждую пробирку вносили по 2 капли бактериальной взвеси микробов, содержащей в 1 мл 500 млн. микробных тел (по бактериальному стандарту). Пробирки встряхивали и ставили в термостат на 10 дней. По истечении этого срока из верхнего слоя среды при помощи пастеровской пипетки де-

лали мазки, фиксировали в метаноле (5 минут) и обрабатывали по следующей схеме (метод Боя—Поляковой):

- | | |
|--------------------------------------|---------|
| 1. Аурамин ОО-родамин С | 15 мин. |
| 2. Промывание дистиллированной водой | |
| 3. Обработка солянокислым спиртом | 15 сек. |
| 4. Гашение фона кислым фуксином | 2 мин. |
| 5. Гашение фона синькой Леффлера | 2 мин. |

Затем мазки тщательно промывали в дистиллированной воде и просматривали в люминесцентном микроскопе МЛ-2 (светофильтры СЗС-7, ФС-1, БС-8, ЖС-18).

Отсутствие микроколоний микобактерий в исследуемых препаратах позволило определить бактерицидную концентрацию антибиотика (фото 2).



Рис. 2. Микроколонии *M. tuberculosis* (*T. avium*) в люминесцентном микроскопе. Обработка по методу Боя — Поляковой ($\times 900$).

Атипичные варианты микобактерий получали в специально проведенных с этой целью опытах, используя для работы концентрацию микробов 500 млн. в 1 мл. Изменчивость биологических свойств возбудителя туберкулеза наступила в результате воздействия на них *in vitro* некоторых физико-химических факторов: 10-кратного нагревания в течение 30 минут до 60° , замораживания и оттаивания, облучения ультрафиолетовыми лучами в дозе 54 000 эрг/мм^2 , 10%-ных растворов — фенола, формалина, азотной кислоты и некоторых антибиотиков (стрептомицин, тетрациклин, неомицин, левомецетин). При этом наблюдалось повышение устойчивости к высокой температуре, фенолу, формалину, азотной кислоте в 10—20 раз, к антибиотикам как *in vitro*, так и *in vivo* (в опытах на белых мышах) в 4—800 раз.

Одновременно у изучаемых нами микроорганизмов изменились и некоторые биологические свойства. Изменчивость была примерно одинакова, несмотря на воздействие различных факторов внешней среды. Изменение

морфологии сводилось к потере типичной формы клеток, появлению крупных, грубых палочек с зернистой цитоплазмой. В некоторых случаях зернистость, наоборот, отсутствовала. При этом микобактерии теряли свою кислотоустойчивость, что затрудняло их выявление по методу Циль—Нильсена. Практически этот метод оказался неэффективным и не мог быть использован для обнаружения атипичных форм *M. tuberculosis* (*T. avium*).

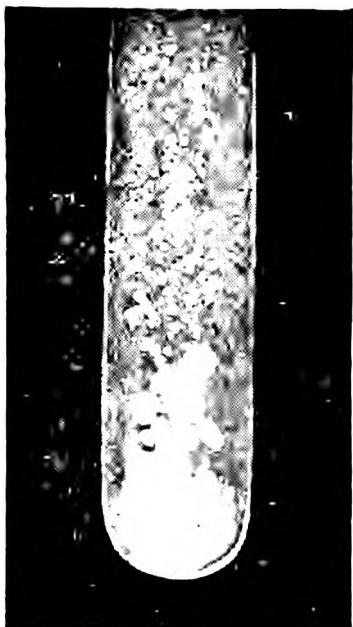


Рис. 3. Уменьшение размеров колоний *M. tuberculosis* (*T. avium*) после воздействия физико-химических факторов.



Рис. 4. Тюрбаноподобные (R-форма) колонии *M. tuberculosis*.

Культуральная изменчивость проявлялась в уменьшении размеров колоний в 3—4 раза (рис. 3), замедлении роста микробов на среде Петраньяни, появлении тюрбаноподобных колоний R-формы (рис. 4). Биохимическая атипичность выражалась в отсутствии пероксидазной активности.

Получение атипичных вариантов позволило присту-

пить к изучению их люминесцентных свойств. Попытка применить такой флюорохром как акридин оранжевый не дала положительных результатов. Аналогичные данные приведены в работе И. К. Целларнус и К. В. Шмалий (1962).

Препараты готовили из 20-суточной культуры микобактерий, полученной на среде Петраньяни. После фиксации препарат обрабатывали по методу Боя—Поляковой и просматривали в люминесцентном микроскопе МЛ-2 (светофильтры СЗС-7, ФС-1, БС-8, ЖС-18).

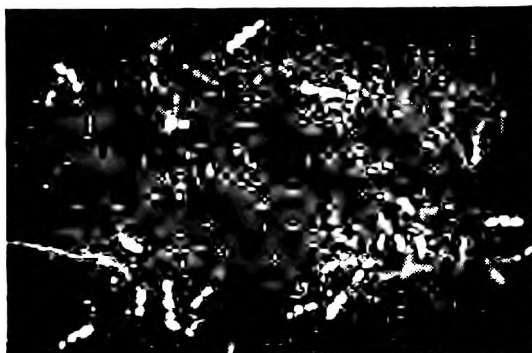


Рис. 5. Атипичные варианты *M. tuberculosis* (*T. avium*) в люминесцентном микроскопе.

В результате микроскопического исследования 200 препаратов установлено, что метод Боя—Поляковой позволяет не только выявить микобактерии туберкулеза, но и изучить внутреннюю структуру клеток. При этом установлено, что клетки исходных типичных культур *M. tuberculosis* (*T. avium*) светятся ярким золотисто-оранжевым светом, в то время как атипичные варианты приобретают зеленоватое свечение (рис. 5).

Выводы

1. Под влиянием вышеуказанных физико-химических факторов в опытах *in vitro* и антибиотиков в опытах *in vitro* и *in vivo* происходит изменение некоторых биоло-

гических свойств *M. tuberculosis (T. avium)*, что приводит к появлению ее атипичных вариантов.

2. Под влиянием стрептомицина микобактерии теряют кислотоустойчивость, что исключает возможность их выявления в мазках из патологического материала по методу Циль—Нильсена.

3. Метод Боя—Поляковой позволяет выявлять не только типичные варианты микобактерий (яркое золотисто-оранжевое свечение), но и атипичные (зеленоватое свечение).

Изучение чувствительности сальмонелл к антибиотикам при комбинированном применении

Ф. Е. ТИМОФЕЕВ, И. А. ТКАЧИК,
А. К. СВИРИДЧУК

Многочисленные данные литературы (В. К. Кузьмин, И. М. Тершин, 1962; Н. Г. Оганесян, Т. А. Демченко, 1958; А. М. Гнетьев, 1959; Л. Г. Кузьмина, 1966; А. Д. Коваленко, 1964) свидетельствуют о появлении в природе микробов, устойчивых к антибиотикам.

Общезвестно, что возникновение лекарственноустойчивых форм микроорганизмов — результат их изменчивости, развивающейся под влиянием химиотерапевтических препаратов, которая способствует понижению чувствительности микробной клетки к действию лекарственного вещества.

Количество возбудителей инфекционных болезней, устойчивых к антибиотикам, из года в год заметно повышается, что является серьезной угрозой для дальнейшего применения этих лекарственных препаратов. Кроме того, патогенные микробы, резистентные к антибиотикам, являются иногда причиной хронических и рецидивирующих заболеваний.