

Къ методикѣ дифференціального распознаванія дифтерійныхъ бациллъ.

Проф. Е. Шепилевскаго.

Для отличія дифтерійныхъ бациллъ отъ ложнодифтерійныхъ въ практикѣ повсюду пользуются свойствомъ этихъ микроорганизмовъ давать т. н. полярныя тѣла, или зерна Babes-Ernst'a, въ различное время послѣ посѣваній на кровяную сыворотку Löffler'a. Въ то время, какъ дифтерійный бациллъ образовываетъ ихъ уже черезъ 9—20 часовъ при температурѣ 35°, въ ложнодифтерійной палочкѣ онѣ появляются значительно позже или даже вовсе не появляются. Эта особенность разсматриваемыхъ бактерий использована съ цѣлю дифференцированія ихъ уже давно Neisser'омъ, который предложилъ специальный способъ окраски зеренъ Babes-Ernst'a, заключающійся въ томъ, что мазокъ на стеклѣ окрашивается сначала метиленовой синькой въ растворѣ съ уксусной кислотой, а потомъ везувиномъ¹⁾. Впослѣдствіи тотъ же авторъ предложилъ для этой цѣли еще и другую окраску, представляющую собою нѣкоторое видоизмѣненіе первой (прибавленіе къ первому раствору кристалъ-віолета и замѣна второго хризоидиномъ²⁾). Для той же цѣли можетъ служить и способъ Ficker'a, въ которомъ уксусная кислота метиленовой синьки замѣнена молочной кислотой³⁾.

Этими способами обезпечено вполне обнаруженіе полярныхъ тѣлецъ въ дифтерійныхъ бактеріяхъ, если они въ нихъ, такъ сказать, созрѣли⁴⁾. Такъ какъ эти способы окраски занимаютъ

1) M. Neisser. Zeitschrift für Hygiene. № 24, 1897.

2) M. Neisser. Hyg. Rundschau 1903.

3) Ficker. Hyg. Rundschau 1892.

4) Употребляю это выраженіе, какъ наиболѣе соответствующее процессу образованія полярныхъ тѣлъ. По моимъ, неопубликованнымъ

всего нѣскольکو минутъ времени, то естественно, что они вошли во всеобщее употребленіе во всѣхъ лабораторіяхъ, и обыкновенно на нихъ только и основывается дифференціальный діагнозъ этихъ бактерій.

Въ подавляющемъ числѣ случаевъ результаты этого діагноза оказываются вѣрными. Но встрѣчаются иногда сомнительные случаи, которые могутъ вести къ непріятнымъ недоразумѣніямъ. Бываютъ случаи, когда съ одной стороны дифтерійныя бактеріи начинаютъ поздно образовывать полярныя тѣльца или даже вовсе ихъ не даютъ. Таковыми бываютъ не только лабораторныя культуры, долгое время перевиваемыя на глицериновомъ агарѣ, но и свѣже выдѣленные. М. Beck встрѣчалъ дифтерійныя бациллы вовсе недававшія зеренъ Babes-Ernst'a¹⁾. Kurth²⁾ и Reichenbach³⁾ также изолировали дифтерійныя бактеріи съ этими свойствами. Съ другой стороны и псеидодифтерійныя бактеріи даютъ иногда рано, въ теченіи однихъ сутокъ и менѣе, полярныя образованія, по которымъ ихъ можно принять за истинныя дифтерійныя. Такой случай представился и мнѣ въ настоящемъ году при изслѣдованіи здоровыхъ воспитанницъ мѣстной женской гимназіи по поводу одного случая дифтеріи, появившагося среди нихъ. Выдѣленная бактерія по первоначальному микроскопическому изслѣдованію, макроскопическому росту на глицериновомъ агарѣ и кровяной сывороткѣ признанная за псеидодифтерійную, давала въ теченіи 20—22 часовъ роста ясныя полярныя тѣльца послѣ нѣсколькихъ пересѣвовъ на средѣ Löffler'a и такимъ образомъ въ окраскѣ по Neisser'y не отличалась болѣе отъ истиннодифтерійной, выдѣленной въ то же время изъ зѣва больной дифтеритомъ воспитанницы.

еще изслѣдованіямъ надъ *B. proteus* при образованіи полярныхъ тѣлъ въ дѣйствительности дѣло идетъ о процессѣ, въ которомъ можно различать два періода. Въ первомъ — на концахъ палочки происходитъ скопленіе какого то вещества или модификація протоплазмы, которое безъ нагреванія не окрашивается даже и сильными красками, какъ фуксинъ и генціанъ-віолетъ. Вслѣдствіе этого на мѣстѣ будущихъ тѣлецъ при окраскѣ обнаруживаются пустоты съ рѣзко обозначенными границами. Во второмъ періодѣ образуется сначала малой а потомъ большей величины зерно, принимающее всякую окраску чрезвычайно легко.

1) M. Beck. Diphtherie. Handbuch der pathog. Mikroorgan. von Kolle und Wassermann.

2) Kurth. Zeitschr. f. Hyg. B. XXVIII.

3) Reichenbach. Zeitschr. f. Klin. Med. B. XXXVIII.

Такъ какъ по первоначальному изслѣдованію горловой слизи воспитанница, у которой оказалась эта бактерія, не была признана зараженною и не была отдѣлена отъ здоровыхъ, то, въ случаѣ ошибки въ діагнозѣ, инфекція могла получить возможность дальнѣйшаго распространенія.

Признаніе истинно-дифтерійныхъ бактерій за ложнодифтерійныя можетъ очевидно также вести къ неправильнымъ мѣропріятіямъ, и въ результатѣ предупрежденіе распространенія болѣзни не будетъ достигнуто.

Въ виду сказаннаго является иногда необходимымъ воспользоваться и другими свойствами разсматриваемыхъ бактерій для обезпеченія вѣрнаго діагноза. И чѣмъ скорѣе возможно это сдѣлать, тѣмъ для практическихъ требованій лучше.

Извѣстно, что ростъ дифтерійнаго бацилла и псевдодифтерійныхъ на питательныхъ средахъ обыкновенно представляетъ лишь количественную разницу, а колоніи ихъ на твердыхъ средахъ по своему виду отличить почти невозможно. На глицериновомъ агарѣ и на сывороткѣ Löffler'a *b. pseudodiphtheriae* растетъ пынѣе и при болѣе низкой температурѣ. Нѣкоторые указываютъ на то, что при этомъ эта бацилла даетъ желтоватый налетъ (Beck¹); другіе, напротивъ, отмѣчаютъ, что у псевдодифтерійныхъ бактерій налетъ имѣетъ чисто бѣлый цвѣтъ (Escherich²). Я наблюдалъ, что выдѣленные изъ горла ложнодифтерійныя бациллы иногда растутъ на кровяной сывороткѣ въ видѣ бѣлаго налета и этимъ рѣзко отличаются отъ истиннаго дифтерійнаго бацилла, а иногда цвѣтъ налета бываетъ такимъ же желтоватымъ, какъ и при этомъ послѣднемъ. Вѣроятно, это зависитъ отъ разновидности самого бацилла.

Въ бульонѣ ростъ истинно-дифтерійнаго бацилла характеризуется образованіемъ крупинокъ, осаждающихся на дно и стѣнки пробирки. Псевдодифтерійныя бациллы даютъ при ростѣ въ бульонѣ равномерную муть (Zarniko³) и др.), но Prochaska⁴) находилъ и въ мутн бульонныхъ культуръ ложнодифтерійныхъ бактерій зерна. По моему мнѣнію этотъ признакъ не настолько явственно выступаетъ, чтобы имъ пользоваться для дифференціального распознаванія.

1) M. Beck l. cit.

2) Escherich. Aetiologie und Pathogenese der epid. Diphtherie. I. 1894. Wien.

3) Zarniko. Centralbl. f. Bact. Bd. 6. 1889.

4) A. Prochaska. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 24. 1897.

По микроскопическому виду эти бактеріи представляют такія незначительныя различія, что объ отличіи ихъ другъ отъ друга не можетъ быть и рѣчи.

Также мало имѣетъ значенія для дифференціальнаго распознаванія и испытаніе вирулентности этихъ бактерій, хотя нѣкоторые авторы этому способу распознаванія и отводятъ выдающееся мѣсто. Хотя ложнодифтерійныя бактеріи и не патогенны при впрыскиваніи ихъ морскимъ свинкамъ, и въ лучшемъ случаѣ даютъ самую незначительную опухоль на мѣстѣ впрыскиванія, но и настоящія дифтерійныя бактеріи могутъ оказаться таковыми, если потеряютъ свою вирулентность. Поэтому и опытъ надъ животнымъ не рѣшаетъ дѣла, а если и рѣшаетъ, то нескоро такъ какъ для выясненія его результатовъ всегда нужно ждать нѣсколько дней.

Есть одно, по всѣмъ даннымъ, весьма постоянное свойство дифтерійныхъ бациллъ, которымъ можно воспользоваться для отличія ихъ отъ ложнодифтерійныхъ. Это — способность ихъ образовывать при ростѣ на питательныхъ средахъ, въ особенности содержащихъ виноградный сахаръ, довольно значительное количество кислоты уже въ первыя 24 часа. Roux и Jersin¹⁾ уже давно отмѣтили это свойство дифтерійныхъ бациллъ. Въ бульонѣ съ глицериномъ образованіе кислоты идетъ сильнѣе. При продолжительномъ ростѣ этихъ бактерій восстанавливается снова щелочная реакція, но у ложнодифтерійныхъ бактерій, по ихъ мнѣнію, это восстановление происходитъ быстрѣе²⁾. Повидимому, въ послѣднемъ заявленіи имѣется какая то неточность. Madsen³⁾ изслѣдовавшій парижскія культуры истинно-дифтерійныхъ бактерій отличаетъ два типа: во первыхъ, типъ, образующій кислоту съ первыхъ дней роста на бульонѣ, при чемъ черезъ нѣсколько дней образовавшееся количество кислоты доходитъ до maximum'a и далѣе не уменьшается; во вторыхъ, типъ „щелочной“, также образующій съ первыхъ дней кислоту, но количество ея съ 5 дня (въ среднемъ) начинаетъ убывать. Признавая за дифтерійными бактеріями эту кислотообразовательную способность Madsen сомнѣвается въ томъ, чтобы Sponck, противорѣчивое заявленіе котораго онъ приводитъ, имѣлъ

1) Roux et Jersin. Annales de l'Institut Pasteur 1888.

2) Roux et Jersin. ibid. 1889.

3) Th. Madsen. Zeitschrift für Hygiene. XXVI. 1897.

4) Zarniko. L. cit. p. 228.

дѣйствительно, какъ онъ говоритъ, культуру истинно-дифтерійной ба-
циллы, такъ какъ она съ первыхъ же дней роста не давала кислоты. На
образованіи дифтерійными бактеріями кислоты настаивалъ Запніко⁴⁾,
который въ этомъ явленіи видѣлъ фундаментальное различіе между
этимъ бактеріями и ложнодифтерійными, не образующими, по его
мнѣнію, кислоты. Такого же мнѣнія придерживается и Про-
chaska¹⁾, который указываетъ кромѣ того еще на одно очень
важное обстоятельство, а именно, что псеидодифтерійныя бациллы
въ 3—4 дня роста даже увеличиваютъ щелочность среды, между-
тѣмъ какъ изслѣдованныя имъ дифтерійныя бактеріи съ первыхъ
дней роста вырабатывали кислоту, и только лишь черезъ недѣли
и даже мѣсяцы въ культурахъ появлялась щелочная реакція.

М. Neisser²⁾, предлагая свой дифференціальный способъ
окраски, говоритъ, что „образованіе дифтерійными бациллами кис-
лоты есть вполнѣ постоянный признакъ этихъ бактерій“. Ему
встрѣтился лишь одинъ разъ бациллъ, похожій на дифтерійный,
который продуцировалъ кислоту въ той же степени, какъ и нѣко-
торыя дифтерійныя бациллы. Вообще же по его наблюденіямъ
псеидодифтерійныя бациллы если и образуютъ кислоту, то очень мало.

Мы имѣемъ далѣе изслѣдованія Кнаппа³⁾, удостовѣрившія,
что прибавленіе къ бычачьей сывороткѣ различныхъ видовъ сахара
(декстрозы, маннита, мальтозы и декстрина) и нѣкотораго количе-
ства лакмуса въ видѣ настойки даетъ возможность различать обараз-
матриваемые вида микроорганизмовъ, такъ какъ *b. diphtheriae* раз-
лагаетъ прибавленный сахаръ съ образованіемъ кислоты, вслѣдствіе
чего лакмусъ краснѣетъ. При ростѣ на такой средѣ *b. pseudodiph-*
theriae образованія кислоты не происходитъ, и она остается синей.

Въ послѣднее время Thiel⁴⁾, испытавъ ростъ различныхъ
культуръ того и другого вида на средѣ Барзикова съ прибав-
леніемъ винограднаго сахара, вывелъ слѣдующее заключеніе: *b.*
diphtheriae образуетъ при этихъ условіяхъ большое количество
кислоты уже въ теченіи 24 часовъ при 37°, вслѣдствіе чего среда
краснѣетъ; всѣ бактеріи, похожія на дифтерійную ни винограднаго,
ни молочнаго сахара не разлагаютъ съ сколько нибудь значитель-

-
- 1) Prochaska. Zeitschrift für Hygiene. Bd. 24. 1897. стр. 386.
 - 2) M. Neisser, l. cit. стр. 452.
 - 3) Кнапп. Centralbl. f. Bact. Ref. Bd. 36. № 12/13.
 - 4) Dr. Thiel. Hyg. Rundschau. Bd. XVII. 1907. № 21.

нымъ образованіемъ кислоты. Различіе между тѣми и другими рѣзкое, и поэтому Thiel предложилъ среду Барзикова съ винограднымъ сахаромъ въ качествѣ дифференціально-діагностическаго средства для этихъ бактерій.

Этимъ предложеніемъ воспользовался Schuppius и результаты его изслѣдованій проводитъ Dr. Thiel (l. c.). Schuppius изслѣдовалъ 14 различныхъ культуръ истиннодифтерійныхъ бактерій и 9 ложнодифтерійныхъ на ихъ отношеніе къ средѣ Барзикова съ винограднымъ сахаромъ. Въ результатѣ оказалось, что всѣ дифтерійныя культуры въ теченіи 24 часовъ производили сильное покраснѣніе среды; псеидодифтерійныя бациллы и ксерозный бациллъ или вовсе не измѣняли первоначальный цвѣтъ ея, или онъ иногда переходилъ въ слабо — красный.

Такимъ образомъ можно признать, что образованіе бактеріями дифтеріи значительнаго количества кислоты въ особенности въ средахъ, содержащихъ виноградный сахаръ, есть явленіе постоянное, отличающее ихъ отъ псеидодифтерійныхъ бациллъ. Поэтому противорѣчивыя заявленія Sudeck'a¹⁾, который указываетъ на то, что встрѣчаются и псеидодифтерійныя бациллы, образующія кислоту, и Peters'a²⁾ принимающаго, что разница въ образованіи кислоты тѣмъ и другимъ видомъ не настолько значительна, чтобы ею можно было пользоваться съ діагностическою цѣлью, относятся или къ рѣдкимъ исключеніямъ, или основываются на недоразумѣніи.

Лѣтъ пять-шесть тому назадъ, при массовыхъ изслѣдованіяхъ горловой слизи у воспитанницъ учебныхъ заведеній, я сдѣлалъ попытку использовать разсматриваемую особенность дифтерійныхъ бациллъ съ діагностическую цѣлью и примѣнилъ для этого методу, оказавшую мнѣ хорошіе услуги какъ тогда, такъ и теперь.

Исходя изъ того соображенія, что кислото-образовательная способность дифтерійныхъ бациллъ будетъ проявляться лучше всего на такой средѣ, на которой эти бактеріи растутъ скорѣе и пышнѣе, я, для дифференцировки ихъ отъ псеидодифтерійныхъ, избралъ извѣстную среду Löffler'a (3 части сыворотки + 1 часть бульона съ 10%-нымъ содержаніемъ винограднаго сахара). Для обнаруженія же образовавшейся кислоты я прибавлялъ къ ней нѣкоторое количество кислаго фуксина, обезцвѣченнаго при помощи

1) Sudeck. Festschrift zu Feier des 80-jährig. Stiftungsfestes des ärztl. Vereins zu Hamburg 1896. Цит. по Handbuch der pathog. Mikroorg.

2) Peters. Deutsche medicinische Wochenschrift. 1897.

ѣдкаго натра. Обесцвѣченный фуксинъ при ростѣ дифтерійныхъ бактерій сейчасъ же принимаетъ снова красную окраску, тогда какъ ложнодифтерійная палочка нисколько не измѣняетъ цвѣта среды.

На практикѣ лучше всего поступать слѣдующимъ образомъ: Двухъ-процентный кислый фуксинъ въ колбочкѣ доводится до кипѣнія и въ это время къ нему прибавляется по каплямъ растворъ ѣдкаго натра до тѣхъ поръ, пока красный цвѣтъ краски не перейдетъ въ бурый, или бурый съ небольшою примѣсью красного цвѣта. Излишка ѣдкаго натра въ растворѣ не должно быть. Послѣ этого растворъ фильтруется, еще разъ кипятится и прибавляется къ жидкой еще Löffler'овской сывороткѣ въ количествѣ 4—5 капель на 10 кубич. сантим. ея. Затѣмъ сыворотка свертывается въ пробиркахъ въ косомъ положеніи по общимъ правиламъ. Полученная среда по своему цвѣту почти не отличается отъ обыкновенной сыворотки Löffler'a. Нисколько также не страдаетъ пригодность ея для роста какъ дифтерійныхъ, такъ и ложнодифтерійныхъ бактерій. Мнѣ всегда казалось, что они растутъ на этой средѣ, не смотря на примѣсь фуксина, даже немного лучше, чѣмъ на той же средѣ безъ него.

Послѣвъ бактерій, видъ которыхъ надо установить, производится штрихомъ по поверхности косо застывшей среды, послѣ чего застѣянные пробирки ставятся въ термостатъ при 36—37° Ц.

Уже черезъ 12—14 часовъ въ пробиркахъ съ послѣвомъ истинныхъ дифтерійныхъ бактерій начинаетъ восстанавливаться красный цвѣтъ кислаго фуксина сначала внизу, а потомъ и по всему протяженіи штриха. Черезъ 24 часа получается широкая красная полоса, на которой въ срединѣ выдѣляется свѣтлый бактерійный налетъ.

Въ пробиркахъ съ ложнодифтерійной бактеріей не замѣчается ни въ это время, ни позже никакого измѣненія въ цвѣтѣ среды.

Явленіе окрашиванія среды въ красный цвѣтъ выступаетъ совершенно рѣзко и отчетливо.

Въ настоящее время при совершенно другихъ обстоятельствахъ и въ другомъ мѣстѣ (въ г. Юрьевѣ) мнѣ снова представилась надобность обратиться къ своему способу дифференцировки въ случаѣ, казавшемся очень сомнительнымъ, вслѣдствіе того что, какъ сказано выше, выдѣленные бациллы давали положительныя результаты при окраскѣ по Neisser'y не смотря на то, что они, повидимому, были псейдодифтерійныя. Послѣвъ на среду съ кислымъ фуксиномъ и на этотъ разъ разрѣшилъ возникшее было сомнѣніе.

Въ виду всего этого я и полагаю, что мой способъ дифференцировки дифтерійныхъ бактерій можетъ имѣть свое значеніе въ соотвѣтствующихъ случаяхъ или, по крайней мѣрѣ, подвергнутъ дальнѣйшему испытанію. Сравнительно со способомъ Thiel'я, онъ, мнѣ думается, имѣетъ нѣкоторое преимущество, такъ какъ на средѣ Löffler'a эти бактеріи растутъ лучше и скорѣе, чѣмъ на всѣхъ другихъ средахъ, и слѣдовательно образованіе кислоты при этомъ можетъ быть подмѣчено гораздо раньше.

Ein Beitrag zur Differenzialdiagnose der Diphtheriebazillen.

Von

Prof. E. Schepilewsky.

Die in den Laboratorien angewandte Methode zur Erkennung der Diphtheriebazillen durch die Spezialfärbung nach Neisser der Kerne Babes-Ernst, welche bei den echten Diphtheriebazillen nach 9—20 Stunden, und bei den Pseudo-Diphtheriebazillen bedeutend später erscheinen, geben nicht immer zuverlässige Resultate, da man auf der einen Seite Diphtheriebazillen trifft, welche diese Kerne sehr spät oder überhaupt keine bilden, hingegen auf der anderen Seite, zuweilen auch bei den falschen Diphtheriebazillen, erscheinen diese Kerne wieder genügend früh.

Andere Eigenheiten dieser Bakterien, wie ihr verschiedenartiges Wachstum auf den Nährböden, so auch die Virulenz, können, ihrer Veränderlichkeit wegen, als Erkennungsmittel nicht dienen.

Eine am meisten beständige, oder sogar, nach einigen Autoren, überaus beständiges Erkennungszeichen der Diphtheriebazillen, ist ihre Fähigkeit auf traubenzuckerhaltigen Nährböden, eine grosse Menge Säure zu produzieren.

Die Pseudo-Diphtheriebazillen dagegen, wie aus vielfachen Untersuchungen hervorgeht, produzieren überhaupt keine Säure, oder nur in sehr minimalen Mengen.

Dieses Kennzeichen der Differenzialdiagnose der genannten Bakterien benutzte ich schon vor 5—6 Jahren in St. Petersburg bei einer Massenuntersuchung des Rachenschleimes von Zöglingen der Lehranstalten und arbeitete dann eine entsprechende Untersuchungsmethode aus. Augenblicklich in Dorpat, bei ähnlichen Verhältnissen, war ich gezwungen, bei einem zweifelhaften Falle, diese, meine ausgearbeitete Methode, anzuwenden und mit gleichem Erfolge.

Die Differenzierungsmethode besteht darin: zu 10 ccm. Löffler'schen Serums (bestehend aus 3 Teilen Blutserum und 1 Teile einer 1 % Traubenzuckerbouillon) setzt man 4—5 Tropfen einer Säurefuchsinlösung, die beim Kochen durch NaOH entfärbt ist, hinzu.

Darauf bringt man den Nährboden in schräger Stellung, nach den allgemeinen Regeln, zur Gerinnung und impft die zu untersuchenden Bakterien auf die Oberfläche des Nährbodens.

Nach 12—24-stündigem Aufenthalt, der mit Diphtheriebazillen geimpften Nährböden, im Thermostat bei 36—37° erscheint, auf der Impfstelle und im Condensationswasser eine rote Färbung in Folge Reduction des Säurefuchsin. Pseudodiphtheriebazillen verändern die ursprüngliche Farbe des Nährbodens nicht.

Der Unterschied zwischen diesen und jenen zeigt sich schon rasch und in sehr deutlicher Form, da das Löffler'sche Serum als hervorragender Nährboden für das Wachstum der Diphtherie resp. Pseudodiphtheriebazillen dient und die Zusetzung von Säurefuchsin diese Eigenschaft absolut nicht beeinträchtigt.