

Сравнительная оценка методов культивирования спирохэт Obermeier'a.

Р. Р. Гельтцера.

Для культивирования спирохэт Obermeier'a предложено, начиная с 1912 года, несколько методов: Nogouchi (1912), Nata (1914), Ungermann'a (1916—1918), Аристовского (1921—1922), Kliegler-Robertson'a (1922), Illert'a (1923) и Аристовского-Гельтцера (1925) г.). Уже самый факт появления различных методов культивирования указывает на те затруднения, которые возникают при решении этой задачи. Культивирование спирохэт Obermeier'a является тем вопросом, над разрешением которого за последние годы непрерывно ведутся работы в Казанском Бактериологическом Институте (Аристовский, Благовещенский, Гельтцер), и результаты, получаемые при помощи предложенных нами методов, невольно напрашиваются на сравнение с результатами других авторов.

Предметом настоящего сообщения и является сравнительная оценка всех этих способов культивирования спирохэт Obermeier'a. Имея в виду, что поверочные опыты культивирования этих спирохэт по методам Nogouchi и Nata были уже произведены раньше Аристовским и Речменским, и в соответствующих работах дана определенная оценка этих методов, мы ограничились, по предложению проф. Аристовского, опытами культивирования по методам Ungermann'a, Illert'a, Kliegler-Robertson'a и параллельно — по способу Аристовского в новой его модификации (лошадиная сыворотка с кусочком стерилизованного мозга кролика или быка), опубликованной вначале истекшего года (Аристовский и Гельтцер, Каз. Мед. Журн., 1925, № 1).

Причина неудовлетворительности метода Nogouchi, повидимому, лежит в применении, в качестве составной части питательной среды, асцитической жидкости, которая, будучи в различных случаях неодинаковой по своему составу, является не всегда пригодной для роста спирохэт. Mühlens, Аристовский и Речменский на этой среде получили отрицательные результаты, и только Plotz'y удалось непосредственно из крови человека получить культуры спирохэт Obermeier'a в 5 генерациях. И сам Nogouchi указывает на неудобства своей методики: у него из 10 сортов асцитической жидкости один только оказался годным.

По способу Nata Аристовский и Речменский имели несколько лучшие результаты, но все же и здесь дело не шло дальше получения первой генерации. Речменский, в 1921 г., на основании своих сравнительных опытов культивирования спирохэт Obermeier'a

по методам Nogouchi, Nata и Аристовского (причем автор пользовался только первоначальной методикой последнего, применяя лишь одну среду—с белком), пришел к выводу, что среда Аристовского имеет ряд технических преимуществ пред средами Nogouchi и Nata, и что при навыке методика Аристовского дает возможность получать ряд поколений.

При проверке метода Ungermann'a, пользующегося особым распространением в Германии, мы, во-первых, произвели попытку получения культуры спирохэт Obermeier'a непосредственно посевом крови больного человека, взятой в различные дни приступа, во-вторых, пытались перевести наш лабораторный штамм со среды Аристовского-Гельтцера на среду Ungermann'a. Последняя, как известно, состоит из кровяной сыворотки молодого кролика, залитой жидким парафином и гретой в течение 1 часа при 60°; перед посевом в среде прибавляется капля свежей крови кролика. Выращивание производится при 30°C. Посевы крови больного человека (6 случаев), взятой в период 1-го или 2-го приступа и в различные дни приступа, были произведены нами 6 раз, причем в 4 случаях в первые же сутки спирохэты погибли; в остальных 2 случаях спирохэты сохраняли свою подвижность, постепенно уменьшаясь в числе. Пересевы этих культур на свежую питательную среду дали неудовлетворительный результат: количество спирохэт прогрессивно уменьшалось,—1 спирохэта на 3—5 полей зрения (Dunkelfeldbeleuchtung, Paraboloid kondensator Zeiss'a, Ob. Leitz'a № 6 a), и культура окончательно погибла.

Попытки перевести наш лабораторный штамм, выращиваемый на свежей лошадиной сыворотке с кусочком стерилизованного мозга быка или кролика, с заливкой жидким парафином, на среду Ungermann'a были произведены также 6 раз. Обычно при этом мы получали на среде Ungermann'a культуру с максимумом развития спирохэт—от 5 до 10 в поле зрения на 3—5 сутки; однако пересевы отсюда снова на среду Ungermann'a для получения 2-й генерации оканчивались неудачей в то время, как контрольные посевы на нашей среде давали обычные, очень богатые культуры (на 2—3-й день от 30 до 40, а иногда и более, спирохэт в поле зрения).

Все же в одном случае нам удалось провести наш лабораторный штамм на среде Ungermann'a в 10 поколениях; в этих культурах в первых поколениях наблюдалось очень энергичное размножение спирохэт (до 20—30 спирохэт в поле зрения), в последующих же поколениях культуры становились все беднее и беднее, так что в культурах 11-й генерации более одной спирохэты в 2—3 полях зрения не наблюдалось.

Таким образом наши наблюдения согласуются с заключением Mühlens'a о методе Ungermann'a. Mühlens говорит, что, по его мнению, „при культивировании спирохэт возвратного тифа на инaktivированной кроличьей сыворотке могут еще встретиться затруднения“.

Shert в своих работах по культивированию спирохэт Obermeier'a пользовался методом Ungermann'a, причем исходным материалом для посева служила ему кровь мышей, инфицированных европейским возвратным тифом (штамм „Moskau“, поддерживаемый в течение многих лет в организме мышей и потерявший патогенность для человека) и африканским возвратным тифом, поддерживаемым в мышцах с 1906 г.

и сохранившим свою патогенность для человека. В одном случае Illert'у удалось получить непрерывно 25 генераций в течение 5 месяцев, в другом—35 генераций в течение 7 месяцев, но, как он пишет, „с однократным перерывом, вследствие применения непригодной сыворотки“. Культуры эти достигали максимума развития (10—20 спирохэт в поле зрения) на 5—6-й день; при выращивании при 37° развитие наступало быстрее; при 30°—32° культуры оставались жизнеспособными более долгое время. Автор отмечает, что в цельной сыворотке уже после нескольких пересевов наступает все увеличивающееся ухудшение роста, и потому предлагает пользоваться кроличьей сывороткой, разведенной физиологическим раствором NaCl в отношении 5:1, с прибавлением маленького кусочка вареного и стерилизованного белка куриного яйца. Пользуясь этой средой, автор получал более богатые культуры, но при этом не указывает количество полученных генераций.

Для сравнительной оценки метода Illert'a мы тоже производили с одной стороны посевы крови больного человека, а с другой—пересевы с нашего лабораторного штамма на лошадиной сыворотке с кусочком мозга. При посевах крови человека (2 случая) в одном случае удалось получить лишь 1 генерацию, в другом—7 генераций, причем на этой среде наблюдалось более богатое развитие спирохэт (30—40 в поле зрения) и более продолжительное сохранение их жизнеспособности, нежели на среде Ungermann'a.

Попытки перевести наш штамм на среду Illert'a (были произведены нами 6 раз. В 1 из этих случаев роста спирохэт не получилось вовсе, в 4—удалось получить только 1 генерацию с максимумом развития спирохэт до 5—6 в поле зрения и в 1—2 генерации. Контрольные посевы на нашей среде давали обычные богатые культуры.

Таким образом, по нашим наблюдениям, и изменения Illert'a в методике Ungermann'a не дают существенного улучшения результатов по сравнению с оригинальным методом Ungermann'a, хотя иногда по богатству культур спирохэтами среда Illert'a имеет преимущества перед средой Ungermann'a, разделяя с этой последней общий недостаток в смысле ненадежности и непостоянства результатов при получении ряда последующих генераций.

Наконец, нами были произведены опыты пересевов спирохэт Obermeier'a с нашей среды на среду, предложенную Kliegler-Robertson'ом. Питательная среда этих авторов состоит из лошадиной сыворотки, разведенной двойным объемом физиологического раствора NaCl с прибавлением на каждые 10 куб. см. смеси 1 куб. сант. 10% пептонного бульона. Рн среды должна соответствовать точно 7,2. Эта смесь разливается по пробиркам в количестве 3—4 куб. сант., перед посевом на каждую пробирку прибавляется капля свежей кроличьей крови, после посева пробирка заливается слоем жидкого парафина высотой в 1,5 сант., выращивание происходит при температуре 28°—30°. Kliegler-Robertson, пользуясь этой питательной средой, неоднократно получали культуры из крови мышей и крыс, зараженных спирохэтами Obermeier'a. Пересевы производились ими через 12—15 дней; жизнеспособность этих культур сохранялась в течение 3—7 недель; иногда рост шел хорошо и при комнатной температуре. При температуре 36° быстрее наступало обратное развитие. Авторы указывают, что один из штаммов поддерживался ими *in vitro* в течение 4 мес., причем было сделано 7 пересевов.

При наших посевах лабораторного штамма на среду Kliegler-Robertson'a часть пробирок мы сохраняли в термостате при t^0 35⁰, а другую—при комнатной t^0 . Через сутки культуры на этой среде, выращиваемые при t^0 35⁰, ничем не отличались от контрольных посевов на нашей среде: на 2-е сутки количество спирохэт в каждом поле зрения в культурах по Kliegler-Robertson'у доходило до 12—15—21, т. е. культуры оказывались столь же богатыми, как и контрольные. Но уже на 3-й день стали намечаться признаки обратного развития спирохэт, а на 4-й день—гибель культуры в то время, как контрольные культуры состояли в это время из подвижных и жизнеспособных спирохэт. Пересевы с культур по Kliegler-Robertson'у на 2—3-и сутки, т. е. в момент наибольшего развития спирохэт, снова на среды Kliegler-Robertson'a имели следствием лишь бедное развитие спирохэт, и со 2-го дня в питательной среде наряду с подвижными спирохэтами появлялись в значительном числе дегенеративные формы, а дальнейшие пересевы отсюда оказывались стерильными.

Культура, сохраняемая при комнатной t^0 , не дала богатого развития спирохэт: максимум, 3—5 последних в поле зрения, наблюдался на 4—5-й день, затем стали появляться слабо-подвижные формы, неподвижные, и на 14-й день количество подвижных спирохэт не превышало одной в каждом поле зрения.

Таким образом метод Kliegler-Robertson'a в наших руках оказался совершенно непригодным для сохранения нашего штамма спирохэт даже на протяжении очень небольшого числа генераций. Наши наблюдения убедили нас в том, что, хотя по способам Ungermann'a, Illert'a и Kliegler-Robertson'a, несомненно, удастся получить культуры спирохэт Obermeier'a,—правда, не всегда,—но методам этим присущи: 1) элемент случайности при получении первой культуры спирохэт, 2) постоянная опасность перерыва генераций по неизвестным причинам и невозможность поддерживать штамм спирохэт *in vitro* в длительном ряде генераций и 3) относительная бедность культур.

Оценивая с этих точек зрения результаты культивирования спирохэт Obermeier'a по методам, разработанным в нашем Институте, мы пришли к следующим результатам:

Самая первоначальная методика, данная проф. Аристовским в 1921 г. (разведенная лошадиная или кроличья сыворотка плюс кусочек белка куриного яйца) также страдает в значительной мере только что указанными недостатками. Различным авторам, работавшим с этой средой (Аристовский, Беляков и Шухгальтер, Речменский), удалось на ней получить в общем ограниченное количество генераций (от 4 до 16), и поэтому указанная методика не обеспечивала сохранения штамма *in vitro* в бесчисленном ряде генераций, как и методы других авторов. Модификация первоначального метода проф. Аристовского, предложенная им ид-ром Благовещенским в 1922 г. и характеризующаяся периодическим чередованием питательных сред № 1 и № 2, несомненно дает возможность поддержать штамм спирохэт *in vitro* в бесконечном числе генераций (по этому методу в нашей лаборатории поддерживался штамм спирохэт Obermeier'a в течение около 2 лет, давший 257 генераций и погибший от случайной причины,—загрязнения лошадиной сыворотки посторонними микробами). Однако этот метод имеет

крупный недостаток: благодаря своей сложности и кропотливости, он требует затраты большого количества времени на ежедневный просмотр культур и пересевы из ряда пробирок на новые питательные среды. Кроме того, как это указывалось в работе проф. Аристовского и д-ра Благовещенского, не каждый пересев, сделанный даже с богатой культуры, приводит к развитию следующей генерации, почему при этом способе для сохранения штамма *in vitro* ежедневно приходится делать посевы из ряда пробирок с культурами различного возраста, зная наперед, что развитие следующей генерации произойдет только в некоторых из засеянных пробирок.

Третья модификация метода проф. Аристовского, данная в самое последнее время им и дом Гельтцером, выгодно отличается от предыдущих модификаций и от методов других авторов как своей простотой, так и постоянством результатов. Правда, все наблюдения над культивированием спирохэт Obermeier'a на среде Аристовского-Гельтцера производились, за отсутствием в Казани возвратного тифа, с лабораторным штаммом, первоначально выращившимся по второй модификации метода, но все же результаты выращивания этого штамма по новой модификации представляются нам слишком убедительно и демонстративно говорящими за ее превосходство. Культивирование спирохэт по модификации Аристовского-Гельтцера прежде всего отличается своей простотой, как в смысле приготовления питательной среды, так и в смысле техники пересевов. Наиболее ценным и выгодно отличающим ее от других методов является, однако, то обстоятельство, что пересевы из развившихся культур на новые питательные среды удаются здесь без осячки, и в этом отношении, т. е. в смысле постоянства и закономерности результатов пересевов, данный метод мало чем отличается от результатов культивирования на обычных питательных средах таких нетребовательных микробов, как кишечная палочка, *v. cholerae asiaticae* и т. д. Здесь мы совершенно не встречаемся с теми неожиданностями, которые присущи другим методам культивирования спирохэт Obermeier'a, когда, несмотря ни на богатство исходной культуры, ни на безупречную технику, произведенные посевы на новые питательные среды остаются безрезультатными, и дальнейшее получение генераций становится невозможным.

Пользуясь средой Аристовского-Гельтцера, мы в течение 5 месяцев поддерживаем на ней в прекрасном состоянии наш лабораторный штамм, проделавший к настоящему времени на этой среде 75 беспрерывных генераций. Каждый пересев постоянно дает на 2—3-е сутки культуру спирохэт, содержащую не менее 15—20 экземпляров в поле зрения; нередко встречаются культуры, имеющие до 50 спирохэт в поле зрения, или даже по количеству не поддающиеся учету; при пересевах бедных культур с наступившим обратным развитием обогачение идет медленнее, но все же оно достигает своего обычного максимума.

На этой среде (по последним наблюдениям, произведенным мною совместно с проф. Аристовским) можно сохранять спирохэт Obermeier'a после 2-суточного пребывания в термостате при комнатной t° (при 12—15 $^{\circ}$ C), причем выяснилось, что количество спирохэт постепенно уменьшается (на 14-й день 5—8 в поле зрения), но жизнеспособность их не утрачивается, и пересевы с таких 14-дневных культур

дают рост, достигающий на 3—4-е сутки обычного своего максимума. Это дает возможность производить пересевы культур на новые питательные среды через большие промежутки времени, в 12—14 дней, что, конечно, еще более упрощает всю методику культивирования спирохэт Obermeier'a.

Мы, таким образом, получили уверенность, что наш новый метод культивирования спирохэт Obermeier'a вполне обеспечивает возможность сохранения *in vitro* штамма спирохэт в бесконечном числе генераций, не требуя за собой большого ухода, чего нам не удалось достигнуть помощью других методов, предложенных различными авторами.

Л И Т Е Р А Т У Р А.

- 1) В. М. Аристовский. Каз. Мед. Ж., 1921, № 1.—2) В. М. Аристовский и Н. Н. Благовещенский. Ibid., 1922, № 3.—
- 3) В. М. Аристовский и Р. Р. Гельтцер. Ibid., 1925, № 1.—
- 4) С. С. Речменский. Моск. Мед. Ж., 1924, № 2.—5) E. Illert. Zeit. f. Hygiene u. Infkr., 1923, Bd. 100, H. 3—4.—6) P. Mühlens. Handb. der mikr. Technik von Kraus u. Uhlenhuth, 1923, Bd II.—
- 7) I. I. Kliegler a. O. H. Robertson. Journ. of exper. med., 1922, vol. XXXV, № 3.—8) Беляков и Шухгалтер. Доклад на VI Всер. Съезде Барт. 1922.

D-r R. Hoeltzer (Kasan). Das vergleichende Studium der Kultivierungsmethoden der Spiroch. Obermeieri.

Bei den vergleichenden Züchtungsversuchen der Spir. Obermeieri auf den Nährböden von Ungermann, Illert, Kliegler-Robertson und Aristowsky-Hoeltzer, hat der Autor gezeigt, dass die besten Erfolge, wie an Reichtum, so auch an Regelmässigkeit des Wachstums der Kulturen, werden auf dem Aristowsky-Hoeltzer's Nährboden, welches aus frischen Pferdeserum mit einem Stückchen sterilisierten Gehirngewebe vom Rinde oder Kaninchen besteht, erhalten. Besonders zeigt sich der Vorzug dieses Nährbodens bei der Erhaltung des Stammes in Laboratorium *in vitro*: bei der Anwendung dieses Nährbodens gelang es dem Autor den Stamm in unendlicher Zahl der Generationen (über 150 Gener.) zu erhalten, in dem aber wie auf den anderen Nährböden gelang es nur bis 7—10 Gener. zu führen.
