

Из Казанского краевого института эпидемиологии и микробиологии ТНКЗ
(зам. директора по научной части проф. Р. Р. Гельцер),

К вопросу о выращивании гонококка на средах без асцитической жидкости.

Е. М. Курьянова.

Классический метод культивирования гонококка на питательных средах с прибавлением асцитической жидкости представляет ряд неудобств в получении культур в больших количествах при производстве вакцин.

Из литературы по этому вопросу нам известен целый ряд предложенных питательных сред, в которых асцитическая жидкость заменяется другими, белок содержащими веществами. Так, например, Лишюц рекомендует прибавление 2% раствора яичного белка к мясо-пептонному агару. Пиорковский пользуется для выращивания гонококка средой с молочной сывороткой. Левинталь предложил агар с 5% дефибрированной или цельной крови. Коробкова предложила применять лаковую кровь. Карасева прибавляет к агару смесь мочи с пептоном и лошадиной сывороткой в отношении 1:2. Шпанир к осадку мужской мочи прибавляет 10% глюкозы, 0,3% мочевины и смешивает с агаром в соотношении 1:2. Сегавя устанавливает возможность культивирования гонококка на обыкновенном агаре, предвзительно проводя несколько генераций на кровяных средах. Коле и Лойд утверждают, что для выращивания гонококка необходимы оптимальная концентрация водородных ионов, определенное содержание аминокислот, присутствие витаминов и гормоноподобных веществ, стимулирующих рост гонококка. Левинталь также считает, что витаминная субстанция среды имеет немалое значение для развития гонококка. Бейли, а также Шеришорина указывают, что высокая температура сильно изменяет витаминные среды. Факт плохого влияния такой температуры на среды для гонококка заставляет искать другого метода стерилизации этих сред. В литературе имеются указания на стерилизацию жидких питательных сред без нагревания. Так, Бюссон предлагает стерилизовать асцитическую жидкость 5—10% раствором NaOH или KOH с таким расчетом, чтобы содержание щелочи по отношению ко всей асцитической жидкости составляло $\frac{1}{2}$ %. После наступления стерильности асцитическая жидкость титруется фосфорной кислотой до нейтральной реакции. Жолтенков стерилизует сильно загрязненную кровь и асцитическую жидкость 40% глицерином. Мух 50% глицерином консервирует гемолитическую сыворотку. Кох для консервирования асцитической жидкости прибавляет 2% хлороформа. Гелман стерилизует хлороформом экссудат, применяемый для выращивания гонококков. Шпанир применяет хлороформ для обеспложивания осадка мочи. На каждые 3 к. см материала прибавляет 5 к. см хлороформа.

Мы тоже решили применить хлороформ для стерилизации сред, так как считали, что хлороформ не изменит состава среды, и этот способ нам казался наиболее простым в применении его для производственной практики.

Попытка обесплотить мартеновский пептон и мясную воду хлороформом дала следующий результат: в стерильной посуде был поставлен ряд серий пептического переваривания свиных желудков по Мартену, т. е. бралось 200 г фарша свиных желудков на один литр водопроводной воды и прибавлялись 1% крепкой химически чистой HCl (удельного веса 1,19) и 1% хлороформа. Переваривание велось в термостате при 37°C, не 48 часов, а в течение нескольких суток, до тех пор пока не наступала стерильность. Оказалось, что в 35% этих опытов стерильность не получилась. В случаях же, когда мы брали количество водопроводной воды в два раза больше (на 200 г фарша свиного желудка 2 литра водопроводной воды), среда пептического переваривания оказывалась стерильной.

Что же касается мясной воды, то при помощи хлороформа нам ее не удалось получить стерильной.

После наступления стерильности среда пептического переваривания декантируется с осадка стерильным сифоном в стерильные флаконы и хранится при комнатной температуре; при приготовлении среды для гонококка среда пептического переваривания разводится на половину мясной водой, простерилизованной при 120°—20 мин., и ставится в термостат на 18—20 часов при 37°, после чего устанавливается рН 7,4 NaOH. Нужно сказать, что при установке реакции в среде выпадают голубовато-серые хлопья. Они появляются в то время, как кислая реакция среды переходит в слабо-щелочную. Среда после установки реакции не фильтруется, т. к. осадок незначительный, и мы этим пренебрегаем, а лишь только проверяем на стерильность.

Полученная таким образом среда прибавляется к агару Бейли в соотношении 1:3. На такой среде был получен очень пышный рост гонококка.

Далее на этой среде было проведено выделение гонококка из уретры при мужской гонорее. Посев производился на двух питательных средах в чашках Петри. Одна серия (контрольная) состояла из среды Бейли с асцитической жидкостью, а вторая из агара Бейли с нашей средой. Из 51 случая острой гонорей было отрицательных 10 случаев, в которых гонококки не выросли ни на той, ни на другой среде, хотя в гное они были обнаружены микроскопически как внеклеточно, так и внутриклеточно, но в этих случаях большинство больных было уже подвергнуто лечению. В остальных случаях гонококк вырос на обеих средах. По виду и величине своей колонии гонококка на опытной среде ничем не отличались от колоний контрольной среды. В отношении пышности роста опытный агар не уступал контрольному.

Для более точного суждения о пышности роста в одном случае было сосчитано число колоний гонококков на обеих средах.

При этом оказалось, что на опытной среде развилось 1059 колоний, а на контрольной 672 колонии.

Поскольку способ приготовления агара Бейли является довольно сложным (фильтрация, отстаивание в автоклаве, дробная стерилизация, при этом среда получается не всегда прозрачной), мы решили испытать возможность роста гонококка на готтингеровском агаре (разведения 1:3) рН 7,4 с прибавлением нашей среды. При этом гонококк дал такой же пышный рост, как и на агаре Бейли с асцитической жидкостью. В дальнейшем мы брали уже не агар Бейли для приготовления среды, а готтингеровский агар, и часть последних штаммов была выделена на готтингеровском агаре с нашей средой.

Кроме того, был прослежен рост одиннадцати штаммов гонококка, выделенных в чистой культуре на опытной среде до 60 генераций. Во всех этих генерациях ни в характере роста, ни в морфологии гонококка никаких отклонений не замечалось, гонококк и после шестидесяти генераций не рос на обычных питательных средах.

Штаммы обычно пересеивались на вторые сутки, так как на третьи сутки 50% штаммов не выросло, на четвертые сутки процент пересеиваемости падал до 25%, и на пятые сутки гонококки уже не давали роста.

Затем была проверена пригодность этой среды для хранения штаммов гонококка по способу Михаеля, применяемому для этой цели в нашей лаборатории. Все штаммы, после суточного роста на опытной среде, заливались стерильным жидким парафином и оставлялись в термостате при 37°. Штаммы были жизнеспособны и хорошо пересеивались от 1 до 1½ месяцев; по росту и морфологии не изменились. Но гораздо лучший результат дало хранение штаммов на жидкой среде, приготовленной вышеуказанным способом.

При росте на жидкой среде гонококк в первые же сутки дает на дне пробирки едва заметный осадок, сама среда остается все время прозрачной. На вторые сутки на поверхности среды появляется пленка, вначале она едва заметна, но постепенно она увеличивается, на 4—5-е сутки становится грубой, слегка морщинистой, при сотрясении она легко опадает на дно. С жидкой среды гонококк пересеивается от 8 до 10 суток. При заливке жидким парафином суточной культуры гонококка на жидкой среде, гонококк сохраняется до 3 месяцев, а некоторые штаммы до 4—5 месяцев. На границе соприкосновения парафина со средой образуется такая же грубая пленка.

Обычно пересеивы велись с пленки. Наблюдения по сохранению штаммов ведутся около 2 лет.

Что же касается реакции нашей среды, то рост гонококка происходит на ней в пределах рН 7,0—8,3, ниже и выше этих пределов гонококк не растет.

Следующей нашей задачей было испытать эту среду для приготовления вакцины. Для проверки роста гонококка, в целях приготовления вакцин, опытная среда была прибавлена к агару

Бейли и готтингеровскому агару в матрацах. Для контроля был приготовлен в матрацах агар Бейли с асцитической жидкостью. Во все матрацы было налито одинаковое количество агара по 150 к. см, матрацы брались одинакового размера. Посевной материал был взят в одном и том же количестве—по 3 к. см. Засеянные матрацы ставились на сутки в термостат, после чего смывались 30 к. см физиологического раствора NaCl и проверялись на чистоту роста микроскопически. Смыв отсасывался стерильно в пробирки и прогревался, как обычно, при 56° в течение 1 часа, после чего проверялся на густоту по стандарту. Оказалось, что как на опытной среде, так и на контрольной средняя степень густоты роста почти одинакова и приближается к трем миллиардам в 1 к. см.

Для проверки на токсичность гонококковой вакцины, изготовленной на нашей среде, были приготовлены две серии гонококковой вакцины на физиологическом растворе NaCl, гретой при 56° полчаса, и консервированной 0,5% карболовой кислоты. Обе серии приготовлены одновременно; одна из них приготовлена на готтингеровском агаре со средой, вторая на агаре Бейли с асцитической жидкостью. Опыт поставлен на 36 мышах, которым подкожно вводились опытная и контрольная гонококковые вакцины в равной дозе, т. е. 300 миллионов, 500 миллионов и 1 миллиард микробных тел в объеме 0,3 к. см, причем половине мышей была введена как опытная, так и контрольная вакцина (по 9 мышей) тотчас же после изготовления. Другой половине мышей была введена вакцина в таких же количествах через месяц после ее приготовления. Во всех случаях мыши оставались живы.

При применении людям гонококковой вакцины, изготовленной на нашей среде, оказалось, что она по своей эффективности несколько не уступает гонококковой вакцине, изготовленной на агаре Бейли с асцитической жидкостью (отзывы врачей вендиспансера в Казани).

Для выяснения влияния температуры на среду, был поставлен следующий опыт: жидкая среда, простерилизованная при 120°, дала рост гонококка, но этот рост не был таким пышным, как рост на среде, не подвергавшейся нагреванию. Агар, приготовленный на среде, простерилизованной при 120°, дал очень скудный рост.

Кроме этого, нужно отметить, что нами была испробована наша среда для выращивания менингококков и пневмококков, и при этом был получен хороший результат. Опыты по выращиванию менингококков и пневмококков, а также вопрос о химическом составе приготовленной нами среды составит предмет следующего сообщения.

На основании наших исследований мы позволяем себе сделать следующие выводы:

1) Среда пептического переваривания, не подвергавшаяся стерилизации температурой, обесцвечивается 1% HCl и 1% хлороформа, разбавляется мясной водой, простерилизованной при

120°, пополам и ставится на 18—20 часов в термостат при 37°, после чего устанавливается 7,4 NaOH. Такая среда, прибавленная к готтингеровскому агару в соотношении 1:3, дает пышный рост гонококка.

2) Эта среда может применяться для приготовления гонококковых вакцин, а также для целей выделения и сохранения культур гонококка.

3) Среда для гонококка может быть приготовлена в лабораторной обстановке в любое время и в любом количестве на отечественном агаре.
