

Из Краевого микробиологического института ТНКЗ (директор ин-та д-р С. Ф. Немшилов, научный консультант проф. Р. Р. Гельтцер) и лаборатории кафедры микробиологии Казанского госуд. медицинского института (завед. кафедрой проф. Р. Р. Гельтцер).

Опыты культивирования сыпнотифозного вируса¹⁾.

Проф. Р. Р. Гельтцер и д-р С. Ф. Немшилов.

(Сообщение 1).

Вопрос о возможности выращивания фильтрующихся вирусов *in vitro* на непатогенных микроорганизмах в отношении вируса оспенной вакцины разрешен Зильбером и Востроуховой и вируса сыпного тифа — Зильбером и Доссер, Калиной и Данишевской.

При ознакомлении с предварительным сообщением Зильбера и Доссера в методе культивирования сыпнотифозного вируса на дрожжевых клетках, методе чрезвычайно простом, нам казались весьма заманчивыми те перспективы практического применения, которые открывались при возможности выращивания этого вируса *in vitro* в большом ряде генераций.

Приступая к опытам культивирования сыпнотифозного вируса на непатогенных микроорганизмах, мы остановились на дрожжах вида *Saccharomyces cerevisiae* — расы: М и II вид (дрожжей, примененных Зильбером, Востроуховой и Доссер для выращивания оспенной вакцины и сыпнотифозного вируса нам не был еще известен). В качестве питательной среды были взяты бульон по Готтингеру РН 7,6 и такой же бульон с прибавлением 1% глюкозы; в остальном мы придерживались методики, предложенной Зильбером и Доссер. Кровь сыпнотифозного больного в количестве 0,2—0,3 к. с. добавлялась к молодой, обычно 3—4-часовой к-ре дрожжей и затем выращивание происходило при 36°—37° в течение 8 суток. В дальнейшем производились пересевы 0,5 к. с. взболтанной к-ры на свежий бульон (10,0 к. с.). Дрожжи развивались, образуя осадок на дне, бульон не мутился, при взбалтывании дрожжи равномерно распределялись в жидкости в виде мелких и нежных хлопьев, быстро оседавших на дно. В к-рах на бульоне с 1% глюкозы осадок, состоявший из дрожжей, во много раз превышал по своему объему осадок, получавшийся на простом бульоне, и при взбалтывании жидкость оказывалась совершенно мутной.

Первый посев крови от больного сыпным тифом (10-й день болезни) был произведен 23 мая 1933 г. на вышеуказанные питательные среды с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* раса М. Одновременно же для контроля был сделан посев 0,3 к. с. крови на бульон (10,0 к. с.) без предварительного засева дрожжей. 2 к. с. одной из 8-ми суточных к-р первой генерации этого штамма на среде с глюкозой была заражена подкожно мор. свинка и одновременно таким же количеством контрольного посева — другая мор. свинка. На 10-й день после заражения у пер-

¹⁾ Доклад с демонстрацией препаратов на объединенной научной конференции Микробиологического ин-та, Кафедры микробиологии КГМИ и Кафедры бактериологии Гос. ин-та для усовершенствования врачей 13 января 1934 года.

вой м. свинки температура поднялась с $38,2^{\circ}$ до $41,1^{\circ}$, на следующий день t° $40,9^{\circ}$, затем пала критически несколько ниже нормы (37°); у второй м. свинки (контр.) на 10-й день после введения бульона с добавленной кровью t° $39,4^{\circ}$ (накануне t° — 39), на следующ. день t° — $39,2^{\circ}$. Таким образом большой подъем t° , правда только в течение двух дней, у м. свинки, зараженной к-рой и крайне незначительный подъем t° , в пределах обычных колебаний, у контрольной м. свинки, дали основание предположить, что, повидимому, вирус в к-ре дрожжей в противоположность вирусу на одном бульоне сохранился, хотя и претерпел какие-то изменения, так как продолжительность лихорадки была незначительной. Конечно, здесь играли роль новые условия среды для вируса и возможность не только сохранения, но и развития вируса на дрожжевых клетках должны были показать опыты на животных с к-рами дальнейшего ряда генераций.

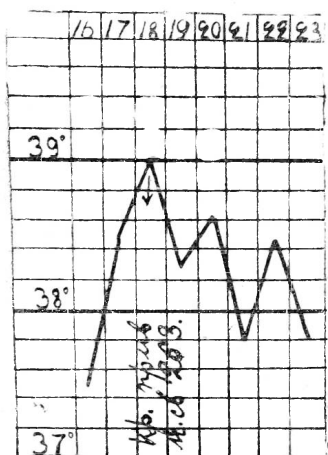
Ободренные этими, хотя и незначительными успехами, мы предприняли в дальнейшем ряд новых посевов крови от различных больных сыпным тифом. Следующий посев крови (II штамм) от больного сыпным тифом (9-й день болезни) был произведен на такие же среды с молодыми к-рами дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, расы М и II. В последующих опытах в связи с тем, что нам стала известной подробная методика выращивания сыпнотифозного вируса на дрожжах, предложенная Зильбером и Доссер, нами были предприняты опыты выращивания этого вируса и на кефирных дрожжах, при чем для сравнительного изучения ценности различных питательных сред и различного рода дрожжей, нами были взяты кроме бульона по Готтингеру и мясопептонного бульона рН 7,2, мясопептонный бульон рН 7,6, бульон с 0,5% лактозы и дрожжи: кефирные и вышеупомянутые расы М и II вида *Saccharom. cerev.* Всего было произведено еще 3 посева от больных: на 14 день бол. (шт. III), на 14-й же день бол. (шт. IV) и на 9-й день бол. (шт. V). В настоящем сообщении мы коснемся лишь результатов наблюдений, полученных при изучении к-р I и II штаммов, а данные наблюдений над культурами III, IV и V штаммов будут изложены во 2 ом сообщении.

Для характеристики культур сыпнотифозного вируса на дрожжах были заражены этими культурами м. свинки с целью изучения колебаний t° , кролики для выявления р. Weil-Felix'a, а для подтверждения специфичности лихорадки у м. св., появляющейся под влиянием заражения культурами, были предприняты прививки крови и мозга таких м. св. свежим м. свинкам и мозга кроликам для получения агглютининов в отношении бац. *Proteus X₁₉*.

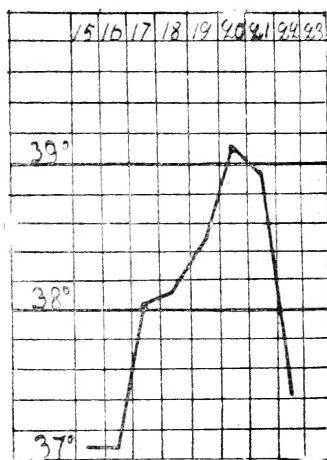
Кроме того м. св., зараженные к-рами, мозгом и кровью, в дальнейшем были испытаны на наличие активного иммунитета путем прививки пассажного вируса и, наконец, мозги зараженных м. св. были подвергнуты патолого-гистологическому исследованию. Заражение морских свинок 8-суточными к-рами производилось подкожно в количестве 2 к. с., кролики заражались к-рами интравенозно, сначала в количестве 1 к. с., а затем мы перешли на заражение 5 к. с. Мозг м. св. удалялся стерильно и готовилась взвесь в физиологическом растворе NaCl в отношении: на целый мозг 15 к. с. физиол. раств. NaCl. Взвесь мозга вводилась м. св. интраперитонеально в количестве 1 к. с., а кроликам в том же количестве интравенозно.

Заражение м. св. было произведено к-рами 1 штамма 16-й генерации и II шт. 15-й генерац. и одной культурой (на дрожжах р. М) в 24-й генерации. Повышение t° обычно отмечалось на 17-й день после заражения (в одном случае при зараж. к-рой II шт. 24 генерац. на 12-й день) в пределах от $0,8^{\circ}$ до 2° ; продолжительность лихорадки от 4 до 6 суток (чаще 6 суток). Во всех случаях заражения наблюдалось падение веса животных.

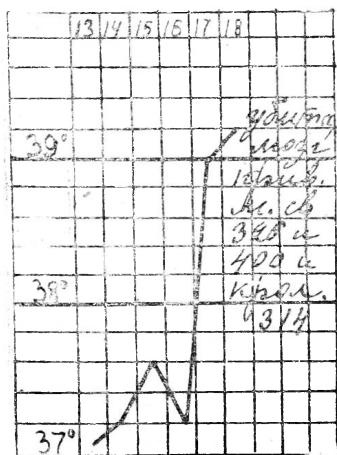
Температурные кривые мор. свин., зараженных к-рами.



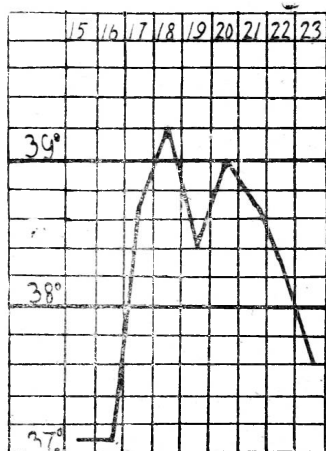
Св. № 142. Зараж. к-рой 53 (I шт.)
16-ой генер.



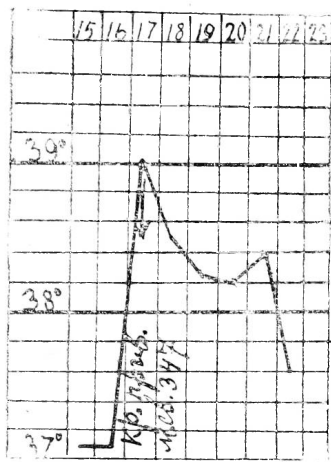
Св. № 200. Зараж. к-рой 52 (I шт.)
16-ой генер.



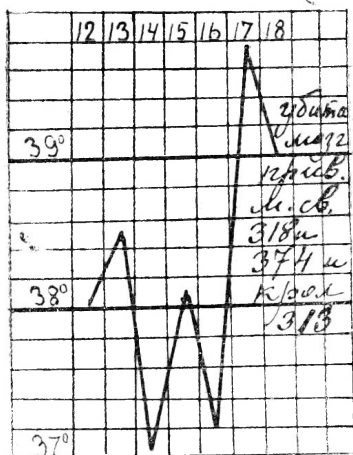
Св. № 141. Зараж. к-рой 78 (II шт.)
15-ой генер.



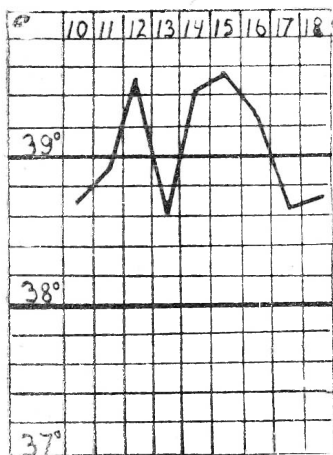
Св. № 113. Зараж. к-рой 79 (II шт.)
15-ой генер.



Св. № 165. Зараж. к-рой 80 (II шт.)
15-ой генер.



Св. № 204. Зараж. к-рой 81 (II шт.)
15-ой генер.



Св. № 358. Зараж. к-рой 123 (II шт.)
24-ой генер.

Контрольные животные, зараженные подкожно 2 к. с. 8-суточной культуры чистых дрожжей или не вызвали вовсе изменений температурной кривой, или же в некоторых случаях давали подъем t° , доходящий до $39,6^{\circ}$ с размахом колебаний t° в $1^{\circ}-2^{\circ}$, но в таких случаях это повышение t° , как реакция организма на введенные дрожжи, появлялось, как правило, на 2—3 день после введения к-ры и длилось обычно не более 1—3 дней.

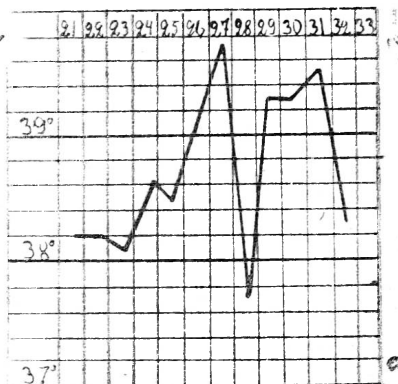
При рассмотрении температурных кривых м. св. зараженных к-рами вируса, необходимо отметить некоторую атипичность этих кривых, несколько укороченную про-

должительность лихорадки и длительный инкубационный период, за исключением одного случая, когда, вместо обычных 16 суток, мы имели 11 суток. Сопоставляя эти данные в отношении продолжительности лихорадки с данными, полученными в опыте заражения к-рой 1-й генерации, где продолжительность лихорадки составляла только 2 дня, можно сделать вывод, что вирус не только сохраняется, но, приспособившись к новым условиям существования, начинает развиваться и наблюдения над к-рой II шт. 24 генер. подтверждают это предположение, так как в этом случае инкубационный период оказался менее длительным, чем в опыте с к-рами 15 генерации.

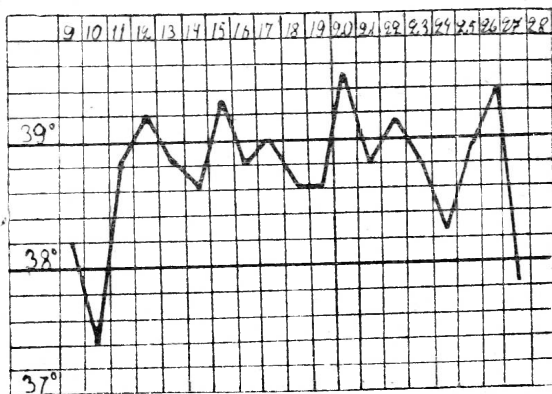
Теперь мы перейдем к рассмотрению опытов заражения м. св. кровью и мозгами м. св., зараженных к-рами вируса. Кровь добывалась при пункции сердца, дефибрировалась и вводилась интраперитонеально в количестве 1,0—1,5 к. с.

У мор. свин., зараженных кровью или мозгом (2-й пассаж), повышение t° отмечалось на 11—18 день после заражения и только в одном случае на 24-й день (кровь взята на 2-й день повышения t°) в пределах от 0,8 до 1,5 $^{\circ}$, продолжительность лихорадки 7—15 суток (чаще 8 суток). Падение веса тела свинок отмечалось во всех случаях заражения.

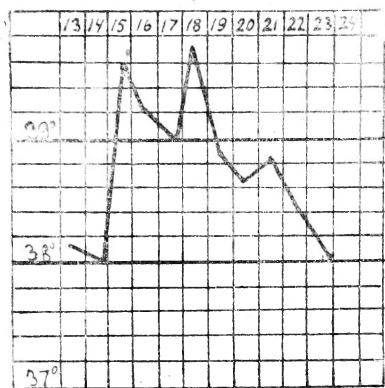
Температурные кривые мор. свин., зараженных кровью и мозгом.
(2-ой пассаж).



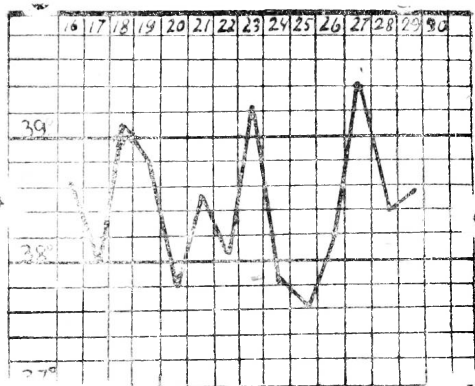
Св. № 263. Зараж. кровью м. св. № 142.



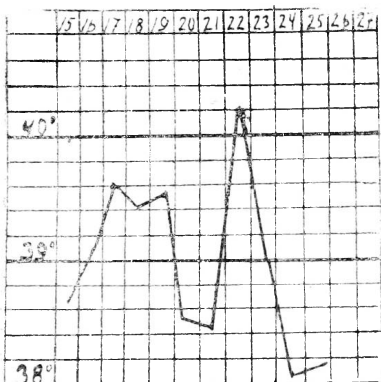
Св. № 326. Зараж. мозгом м. св. № 141.



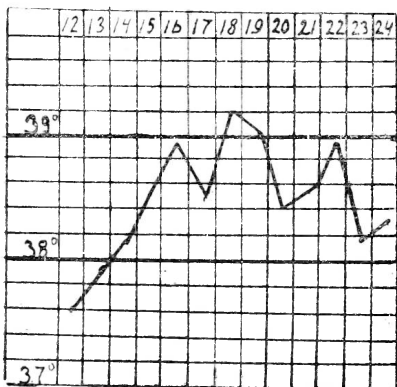
Св. № 400. Зараж. мозгом м. св. № 141.



Св. № 347. Зараж. кровью м. св. № 165



Св. № 318. Зараж. мозгом м. св. № 204.



Св. № 374. Зараж. мозгом м. св. № 204.

Эти опыты показывают нам, что культуральный вирус возможно пасивировать, при чем инкубационный период иногда несколько сокращается и продолжительность лихорадки увеличивается. Специфичность лихорадки находит себе подтверждение в нижеприводимых опытах заражения мозгом некоторых свинок кроликов, которые дали при этом положительную реакцию Weil-Felix'a с титром до 1:50.

Опыты на кроликах.

Для доказательства наличия сыпнотифозного вируса в наших к-рах нами был заражен ряд кроликов, у которых, как известно, эта инфекция протекает в скрытом виде, но при этом появляется положительная реакция Weil-Felix'a обычно с титром 1:40 или 1:60 и лишь в редких случаях с более высоким титром.

Заражение производилось как культурами, так и мозгом мор. свинок, зараженных к-рами. Кроме того для контроля кроликам были введены интравенозно чистые 8-суточные к-ры дрожжей.

Первоначальные опыты заражения 1 к. с. к-р не дало положительных результатов: появление слабоположительной реакции (+) при разведении сыворотки 1:10 с „0“ формой *proteus* X₁₉ у кролика № 13 не убедительно, так как в такой же степени была получена реакция и у контрольного кролика, которому были введены одни дрожжи.

При заражении же к-рами в количестве 5 куб. см. мы получили на 15 день слабоположительную реакцию с формой OX₁₉ при разведении сыворотки 1:5 и 1:10, в дальнейшем отмечалось нарастание титра и на 35-й день можно было определить положительную реакцию Weil-Felix'a, как с формами OX₁₉, так и HX₁₉ при разведении сывороток 1:20 и 1:50, при чем более резко выраженной по своей интенсивности оказались реакции с формой OX₁₉.

У контрольного кролика появилась слабоположительная реакция (+), но при разведениях сыворотки, не превышающих 1:10.

При интравенозном заражении кроликов 1 к. с. взвеси мозга (1:15) морских свинок, зараженных к-рами вируса, можно было также отметить появление положительной реакции Weil-Felix'a и дальнейшее нарастание титра к 35 дню.

Результаты всех этих опытов приведены в таблице (см. стр. 1174-1175).

Кролик № 216 был заражен взвесью мозга морской свинки, зараженной пассажным вирусом (3-й пассаж), полученным нами при заражении м. св. кровью сыпнотифозного больного. В этом случае сыворотка кролика дала положительную реакцию Weil-Felix'a на 15-й день при разведении 1:20 и дальнейшее нарастание титра, при чем на 35-й день р. оказалась положительной при разведении 1:100.

Таким образом, на основании полученных результатов опытов заражения кроликов, мы можем сказать, что в наших к-рах действительно содержится сыпнотифозный вирус и что повышение t° у морских свинок, зараженных этими к-рами, также вызвано сыпнотифозным вирусом, т. е. лихорадка является специфической.

Кроме всех приведенных доказательств в пользу специфичности вируса наших культур, нами были еще поставлены опыты, имевшие целью выяснить состояние активного иммунитета у мор. свинок, зараженных этими к-рами.

Появление иммунитета после первого заражения вирусом сыпного тифа, т. е. когда повторное заражение не вызывает инфекции, как известно, может служить доказательством в пользу специфичности инфекции, вызванной первым заражением, Weil и Breinl, Singer считают, что м. св., перенесшие сыпной тиф любой тяжести, в том числе в виде стертых и бессимптомных форм, приобретают иммунитет к повторному заражению их сыпнотифозным вирусом, при чем эта невосприимчивость может продолжаться до 1-го года. Однако ряд авторов: Nicolle, Conseil, Conop, Гамалея, В. Барыкин, Компанеец, Захаров и О. Барыкина указывают на то, что стойкий и длительный иммунитет приобретается у мор. свинок лишь в результате перенесения типичной формы инфекции, при заражении же вирусом в недостаточной дозе, жи-

[illegible]

с сыворотками кроликов.

[illegible]

животные или совсем не обнаруживают сопротивляемости к повторной инфекции или проявляют очень слабую сопротивляемость.

В наших опытах повторному заражению пассажным вирусом были подвергнуты м. св., зараженные культурами, мозгом м. св., зараженных к-рами (2-й пассаж) и зараженные кровью сыпнотифозных больных. Повторное заражение вирусом производилось на 5—6 й неделе после перенесения инфекции, при чем пассажный вирус применялся 4, 5 и 6-го пассажей, когда он при заражении 1 к.с. взвеси мозга (1:15). взятого на 3—4 день лихорадки, будучи введен интраперитонеально, вызывал всегда появление лихорадки на 6—7 день. Во всех этих опытах повторного заражения появлялась лихорадка, в том числе и у м. св., зараженных кровью сыпнотифозного больного. Необходимо отметить все же, что по сравнению с контрольным заражением м. св. ранее не инфицированных, иногда срок инкубации увеличивался на 2—3 дня, в течении лихорадки иногда наблюдались глубокие ремиссии, доходящие до нормальной, для данной свинки, температуры.

Таким образом, данные этих опытов не могут служить звеном в цепи доказательств специфичности вируса.

Может быть опыты повторного заражения дали бы иные результаты, если их провести с кровью сыпнотифозных больных, так как пассажный вирус, приспособившись к организму м. св., приобретает высокую степень вирулентности по мере пассирования и становится своего рода *virus fixe* для мор. свинки, и в таком случае в силу различия свойств исходного и пассажного вирусов, даже в значительной степени выраженная сопротивляемость после перенесения инфекции, вызванной культуральным вирусом или кровяным вирусом человека, будет сломлена при применении такого пассажного вируса.

Патолого-гистологическое исследование мозгов ряда морских свинок, зараженных к-рами сыпнотифозного вируса, кровью больных сыпным тифом и пассажным вирусом, еще не закончено. Из имеющихся 4-х протоколов¹⁾ приводим следующие.

М. св. № 204 (заражена подкожно 2 к. с. к-ры II шт. 15 генер., инкубация 16 дней, уб. на 2-й день лихорадки).

1) Набухание и местами небольшое размножение эндотелия кровеносных сосудов.

2) Кровоизлияние вокруг мелких сосудов и местами в паренхиме.

3) Отдельные гранулемы, выраженные в средней степени.

4) Нейронофагия.

5) Инфильтрация клеточн. элементами мягкой мозговой оболочки.

М. св. № 215 (заражена интраперитонеально 4 к.с. дефибринир. крови 6-го сыпным тифом, инкубация 6 дней, уб. на 3-й день лихорадки).

1) Пассивная гиперемия сосудов мозга.

2) Местные кровоизлияния вокруг сосудов.

3) Выражена нейронофагия.

4) Набухание и разрастание эндотелия сосудов очень слабое.

¹⁾ Патолого-гистологическое исследование производится прив.-доц. кафедры патологической анатомии Каз. гос. мед. ин-та д-ром А. В. Голяевым. Пользуясь случаем, мы приносим глубокую благодарность д-ру А. В. Голяеву за принятый на себя труд по проведению этих исследований.

Таким образом и данные патолого-гистологического исследования мозга м. св., зараженной к-рой сыпнотифозного вируса, подтверждают специфичность лихорадки и убеждают нас в том, что в к-рах с дрожжами выращивается, несомненно, вирус сыпного тифа.

Интересным является сопоставление изменений в мозгу м. св. № 204, вызванных к-рой, и в мозгу мор. свинки № 215, зараженной кровью б-го сыпным тифом. Специфические изменения, вызванные при заражении к-рой, выражены даже гораздо резче, нежели те же изменения у м. св., зараженной кровью б-го, несмотря на то, что в последнем случае кровь была введена в количестве в 2 раза превышающем количество к-ры и при том интраперитонеально.

Таким образом, на основании всех вышеприведенных опытов, возможность выращивания сыпнотифозного вируса на дрожжевых клетках, доказанная Зильбером, Доссер, Калиной и Данишевской, подтверждают и наши исследования.

Выводы.

1. Выращивание сыпнотифозного вируса из крови больного сыпным тифом человека в к-рах с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* в большом ряде генераций возможно.

2. К-ры этого вируса при заражении м. св. вызывают появление лихорадки, сопровождающейся падением веса; мозг таких морских свинок, будучи введен интравенозно кроликам, обуславливает образование агглютининов в отношении О и Н форм *proteus* X₁₉; перевивкой мозга и крови таких м. св. возможно пассировать этот вирус.

3. Заражение кроликов к-рами приводит к образованию агглютининов в отношении О и Н форм *proteus* X₁₉.

4. Патолого-гистологическое исследование мозга м. св., зараженной к-рой сыпнотифозного вируса, соответствуют тем изменениям, которые наблюдаются при заражении м. св. кровью сыпнотифозного б-го или пассажным вирусом.

5. Укороченный период лихорадки, атипичность ее, сравнительно медленное нарастание титра сывороток в отношении р Weil Felix'a, по-видимому, указывают на некоторое ослабление вируса при выращивании его на примененных нами дрожжах.

Дальнейшие наблюдения по выращиванию сыпнотифозного вируса, опыты вакцинации и применения полученной нами сыворотки послужат предметом следующего сообщения.

Литература. 1. Зильбер Л. А. и Востроухова Е. И. Выращивание фильтрующихся вирусов на негатовенных микробах. Сов. Вр. газ. 1932 г. № 15-16.—2. Они же. Культура оспенной вакцины *in vitro*. Журнал микробиологии и иммунобиол., т. XI, вып. 1, 1933 г.—3. Зильбер Л. А. и Доссер Е. М. К-ры сыпнотифозного вируса. Сов. Вр. газ. 1933 г. № 7.—4. Они же. Культуры сыпнотифозного вируса. Ibidem № 15-16.—5. Калина Г. П. и Данишевская А. М. Опыт культивирования сыпнотифозного вируса на дрожжевых клетках. Ibidem № 12.—6. Барыкин В. А. и Добрейцер Н. А. Сыпной тиф. 1932 г.—7. Барыкин В., Компанеев А., Захаров А., Барыкина О. Исследования над сыпным тифом. Журн. exper. биологии и медицины, т. IV, № 10-11, 26 г.—8. Otto R. и Munter H. Fleckfeber. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle, Kraus и Uhlenhuth III Aufl. Bd. VIII, 1930 г.—9. Weil E. и Breinl E. Untersuchungen über die experimentelle Fleckfieberinfektion und Immunität. Zschr. f. Immunitätsforsch. etc. Bd. 37. 1923 г.