

## О культивировании спирохеты Obermeier'a.

(Сообщено в Обществе Врачей при Казанском Университете 5 февраля 1920 года).

Преподавателя Университета В. М. Аристовского.

(С 4 рисунками).

В настоящее время мы знаем несколько видов кровяных спирохет человека. Наилучше изученными являются следующие четыре вида: 1) спирохета Obermeier'a, или *spir. recurrentis*, возбудитель европейского возвратного тифа, открытая Obermeier'ом в 1873 г., 2) *spiroch. Duttoni*, возбудитель африканской формы возвратного тифа, открытая Ross'ом и Milne'ом, а также Dutton'ом и Todd'ом в 1904 г., 3) *spiroch. Kochi*, открытая в 1905 г. Koch'ом в Восточной Африке (при исследовании *Leckenfieberkrankungen*), и, наконец, 4) *spiroch. Novu*, возбудитель американского возвратного тифа, открытая в 1906 году Nogris'ом в Америке и подробно изученная Novu и Кнарр'ом. Исследованиями целого ряда авторов (Novu и Кнарр, Fraenkel, Uhlenhut и Haendel, Manteufel, Schellack, Strong и др.) установлено, что эти четыре вида спирохет несомненно отличаются друг от друга, как морфологически, так и в отношении реакций иммунитета, патогенности для лабораторных животных и пр. С другой стороны, несмотря на то, что о существовании спирохет мы знаем давно (родовое понятие „спирохеты“ установлено Ehrenberg'ом в 1875 г.), многое остается нам в области учения о спирохетах неясным. Достаточно указать, хотя-бы на то, что остается нерешенными даже вопрос, к какому классу живых существ следует отнести спирохет,—к бактериям или протозоям. Многие кардинальные вопросы, касающиеся морфологии и истории развития спирохет, остаются также нерешенными или разрешаются различными исследователями по разному, часто даже

противоположно. Таковы вопросы о продольном и поперечном делении спирохет, о существовании полового способа размножения, особых форм развития спирохет (Ruheformen, Dauerformen и т. п.). Одной из главных причин такой неполноты наших сведений о спирохетах является, как мне кажется, то обстоятельство, что почти до самого последнего времени мы не умели получать культуры спирохет на искусственных питательных средах, вследствие чего были лишены возможности наблюдать и изучать жизнь спирохет при наиболее благоприятных для наблюдателя условиях чистой разводки: не могли по своему усмотрению изменять жизни спирохет в целях эксперимента для решения того или другого вопроса и т. д. Отсутствие же культур патогенных спирохет имело своим следствием недостаточность и неточность наших знаний о реакциях иммунитета при спирохетных заболеваниях у человека и животных.

К настоящему времени имеется уже большая литература, касающаяся вопроса о культивировании патогенных спирохет человека, гл. обр. *spiroch. pallida*. На изучение методики культивирования этой спирохеты было направлено внимание целого ряда лиц почти тотчас после открытия бледной спирохеты Schaudinn'ом и Hoffman'ом. В результате многочисленных исследований различных авторов (Volpino и Fontano, Levaditi и Macfintosch'a, Mühlens'a, Шерешевского, Tomaschewskogo, Szesci, Sowade, Шапиро, Schramine, Proca, Danilo Schitae, Nogouchi) мы все же не имеем и теперь надежного и верного способа культивирования *spiroch. pallida*, хотя, несомненно, некоторым авторам, как, напр., Nogouchi, удалось получить чистую культуру этой спирохеты. Однако метод Nogouchi в руках целого ряда других исследователей не дал положительного результата, и нужно признать, что исследования Nogouchi решили вопрос о возможности культивирования бледной спирохеты скорее принципиально чем с практической точки зрения.

Не лучше обстоит дело и с опытами культивирования *spirochaes Obermeiera*. Ни одна из кровяных спирохет человека не была получена в культуре в собственном смысле слова до 1912 года. Опыты Novy и Knapp'a, Duval'a и Todd'a, Norris'a, Pappenheim'a и Flournoy, Levaditi, Шерешевского, Mühlens'a и др. трактуют скорее о способах продолжительного сохранения спирохет в жизнеспособном состоянии, чем о способах действительного культивирования их на искусственных питательных

средах. N o g o u c h i был первым, которому удалось получить в чистой культуре кровяные спирохеты человека, в том числе и s p i r o c h . O b e r m e i e r ' a . Питательной средой, на которой N o g o u c h i получил культуры спирохет O b e r m e i e r ' a , K o s c h ' a , D u t t o n i и N o v u , служила асцитическая жидкость с кусочком свежей, стерильной ткани (почки нормального кролика). Нужно отметить, что не всякая асцитическая жидкость является годной для приготовления питательной среды. Указать признаки, которыми можно было-бы руководиться при выборе асцитической жидкости, очень трудно, или, просто говоря, нельзя. В конце концов вопрос о пригодности асцитической жидкости решает опыт посева. Исходным материалом для посева служила кровь инфицированного животного (мыши или крысы). Техника приготовления культуры по N o g o u c h i следующая:

1) В две стерильные пробирки (2 сант. в диаметре и 20 сант. высоты) опускаются кусочки свежей стерильной ткани.

2) В каждую пробирку прибавляется по 10 капель спирохет содержащей крови.

3) Затем туда же прибавляется 15 куб. сант. асцитической жидкости.

4) В одну из пробирок прибавляется 3 куб. сант. парафинного масла, в другую же масла не прибавляется.

5) Пробирки ставятся в термостат при 37°C.

Необходимыми условиями для получения первой культуры и дальнейших генераций N o g o u c h i считает только вполне подходящую асцитическую жидкость и абсолютно свежий, стерильный кусочек ткани. Описанным путем N o g o u c h i получил в течение 6 месяцев 29 генераций спирохеты K o s c h ' a , которая культивируется легче всего, и только 9 генераций других спирохет. M a x i m u m роста спирохеты O b e r m e i e r ' a и спирохеты N o v u достигается на 7 или 8 день, спирохеты D u t t o n ' a и K o s c h ' a —на 9 день. Спирохеты растут как в пробирках с парафинным маслом, так и без него.

На основании своих опытов с культивированием кровяных спирохет N o g o u c h i отмечает у этих спирохет некоторые особенности в смысле условий роста по сравнению с другими спирохетами (s p i r o c h . p a l l i d a , p e r t e n n u i s , m i c r o d e n t i u m , m a c r o d e n t i u m , m u c o s a , r e f r i n g e n s , p h a g a d e n i c a :—тогда как последние спирохеты растут только при строго-анаэробных условиях, кровяные спирохеты, наоборот, при абсолютном отсутствии кислорода не развивают-

ся. Но, в то же время, эти спирохеты до известной степени являются анаэробами, т. е. требуют для своего роста прибавления к питательной среде кусочка свежей ткани. Поэтому Nogouchi называет их аэротропными анаэробами.

Как видно из описания опытов Nogouchi, питательная среда, предложенная им для культивирования спирохет, обладает очень крупным недостатком, ставящим подчас непреодолимые препятствия для ее приготовления. Этим недостатком являются ближе нам неизвестные свойства асцитической жидкости, которыми определяется пригодность ее для приготовления питательной среды. Исследования Nogouchi ясно показывают, что подходящую асцитическую жидкость не так легко иметь под руками. „Нечего удивляться тому“, пишет этот автор, „что из 10 сортов асцитической жидкости различного происхождения только один окажется годным“.

Приступая к изучению вопроса о культивировании спирохеты Obermeier'a, я делал посев крови (а также и сыворотки) больных возвратным тифом на среду Nogouchi, но получил отрицательные результаты: через 12 часов после посева спирохеты были неподвижны и представляли ясные признаки разрушения. Правда, в моем распоряжении было всего 2 сорта асцитической жидкости, которые оба, следовательно, не обладали свойствами, определяющими их пригодность для культивирования спирохет.

Шагом вперед в вопросе о культивировании кровяных спирохет человека, хотя и не Obermeier'овской, а африканской, является исследование Nata. Он удачно культивировал африканскую спирохету на разведенной полусвернутой (при 71°C) лошадиной сыворотке с прибавлением или кусочка свежей ткани, или кровяного сгустка, получающегося при свертывании лошадиной крови. Эта среда является несравненно более доступной даже для небольшой бактериологической лаборатории, чем среда Nogouchi, хотя имеет другое неудобство, — будучи полутвердой и неоднородной, эта среда не позволяет так легко и просто следить за морфологическими изменениями спирохет в культуре, как это можно делать в жидкой среде, из-за присутствия взвешенных в большом количестве кусочков свернувшегося белка. Но с этим недостатком можно бы было мириться, если-бы среда Nata давала положительный результат при посеве spiroch. Obermeier'a. Здесь, однако, дело не обстоит так просто, как это было в опытах Nata с африканской спирохетой. Из засеянных кровью рекуррентика 9 пробирок со средой Nata мне удалось через 48 часов видеть в од-

ной только. пробирке увеличение количества спирохет, в остальных же пробирках не было никакого намека на удачный исход посева. Мало того, и в пробирке, где наблюдалось увеличение количества спирохет, через 72 часа спирохеты были уже неподвижны, и пересевы, сделанные через 48 и 72 часа на новые питательные среды с целью получить вторую генерацию, остались безрезультатными. Вторая попытка получить на среде Nata культуру спирохеты Obermeiera из крови другого больного была еще менее удачна: из засеянных 10 пробирок все остались стерильными. Т. о. я пришел к заключению, что среда Nata является непригодной для культивирования спирохет Obermeiera, а с другой стороны,—имея в виду неудовлетворительность методики Nogouchi, которая сводит попытки культивирования спирохет, в конце концов, к счастливой случайности,—я предпринял ряд опытов с целью разработки верного и по возможности простого способа выращивать спирохету Obermeiera в пробирке на искусственной питательной среде.

В своих опытах я исходил из следующих соображений: раз спирохеты Obermeiera роскошно развиваются в крови больного человека, то, казалось-бы, сыворотка человека должна содержать все необходимые питательные вещества для роста спирохет; процесс свертывания едва-ли может повести к исчезновению этих веществ из сыворотки. И если спирохета Obermeiera все же не дает культуры в пробирке на человеческой сыворотке, то причину этого обстоятельства нужно искать скорее не в недостатке питательных веществ, а в нашем незнании других условий роста спирохеты, которые она встречает, развиваясь в крови человека, или можно допустить, что в сыворотке, при наличии необходимого питательного материала, содержатся вещества, губительно действующие на спирохеты и образующиеся, быть может, в период свертывания крови. Исходя из этих соображений, я прежде всего старался изучить отношение спирохет к человеческой сыворотке и в скором времени убедился, что в зависимости от температуры, при которой содержится сыворотка со спирохетами, эти последние исчезают то быстро—в течение нескольких часов, при 37° С. то значительно медленнее—сохраняясь днями, а иногда и неделями при комнатной и более низкой температуре. При сохранении пробирок при комнатной температуре иногда в течение первых дней приходилось наблюдать даже некоторое увеличение количества спирохет, но это явление непостоянно и зависит, повидимому, от периода болезни, в который берет-



ся кровь от больного человека. Быстрая гибель спирохет при температуре термостата и сохранение в жизнеспособном состоянии при низкой температуре едва-ли можно объяснить недостатком питательного материала, а скорее вяжется с представлением о наличии в сыворотке человека какой-то вредно действующей субстанции, проявляющей свое действие при высокой температуре быстрее, чем при низкой. Задача, таким образом, сводится к тому, чтобы устранить губительное действие сыворотки. Известно, далее, что на различного рода цитолитические процессы задерживающее влияние оказывают посторонние сыворотки и в частности лошадиная сыворотка. Поэтому я приготовил ряд смесей, состоящих из человеческой и лошадиной сыворотки и физиологического раствора хлористого натрия. При посеве крови больного возвратным тифом оказалось, что спирохеты несомненно растут и размножаются в смесях, где количество человеческой сыворотки не превышает 20% и при наличии лошадиной сыворотки 50% по отношению ко всей смеси. Наиболее обильной оказалась культура на среде следующего состава: 2 куб. сант. свежей сыворотки человека, 6 куб. сант. свежей сыворотки лошади и 4 куб. сант. физиолог. раствора хлористого натрия. Вскоре, однако, я убедился, что человеческая сыворотка вовсе не является необходимой составной частью питательной среды, и что спирохеты *Obermeier's* дают культуру просто в смеси лошадиной сыворотки и физиологического раствора хлористого натрия, при условии, чтобы сыворотка лошади была обязательно свежей. В смеси, состоящей из 4 куб. сант. лошадиной сыворотки и 8 куб. сант. раствора хлористого натрия, спирохеты несомненно размножаются, и на 4—5 день после посева получается, — правда, небогатая, — культура спирохет, из которой удастся получить субкультуру на такой же питательной среде. При maximum'e роста удастся видеть 5—6 спирохет в поле зрения, если рассматривать каплю жидкости под микроскопом (*Paraboloid, condensor Leitz'a, Ob. Leitz'a 6, Ocul. 4*).

Не довольствуясь скудным ростом спирохет, я предпринял ряд опытов с целью получить более богатую и обильную культуру. Принимая во внимание указания *Nogouchi*, а также исследования *Nata*, я стал прибавлять к смеси лошадиной сыворотки и физиолог. раствора хлорист. натрия кусочки ткани, кусочки кровяного сгустка из лошадиной и человеческой крови. Однако и при этих условиях богатой культуры получить мне не удалось, хотя должно заметить, что прибавление к питательной среде кусочков ткани или

сгустка все же имеет благоприятное влияние на рост спирохет, особенно, если питательная среда приготовлена на лошадиной сыворотке, сохранявшейся некоторое время при низкой температуре.

Наряду с этим благоприятным влиянием пришлось наблюдать иногда явления противоположного характера, — когда рост спирохет был более обильным на первоначальной среде без прибавления кусочков ткани или сгустка. Я затрудняюсь указать причину этого явления, но, быть может, здесь дело идет о продуктах аутолитического распада, которые и оказывают вредное влияние на развитие культуры. Во всяком случае описанная модификация среды не дала желанных результатов и побуждала продолжать поиски дальше.

Как известно, Noguchі настаивает на том, что кусочек свежей стерильной ткани животного является крайне важной, если не необходимой, составной частью питательной среды для спирохет; однако, если здесь дело идет только о создании условий анаэробизма, то является возможным воспользоваться для этой цели и другими средствами. С другой стороны едва ли позволительно совершенно исключить возможность еще и иных влияний на питательную среду со стороны свежей ткани. Быть может, будет более правильным сказать, что этих сложных влияний мы просто не знаем: тут необходимо учесть как чисто химические, так и физико-химические процессы, причем остается неясной роль ни тех, ни других, как остается неясным, где кроется благоприятное влияние и где начинается губительное действие этих процессов на развитие спирохет. Поэтому естественным является желание упростить дело, исключив по возможности некоторые из этих ближе неизвестных нам процессов.

Исходя из этих соображений, я прежде всего попробовал заменить „свежую“ ткань и „свежий“ кровавый сгусток более индифферентным с химической точки зрения веществом — свернутым белком куриного яйца. Куриное яйцо, лишь бы оно не обладало явными признаками порчи, варится обычным образом в воде „вкрутую“, после чего белок тщательно отделяется от желтка и делится потом на кусочки объемом в 1—2 куб. сант., которые распределяются по пробиркам. Белка из одного куриного яйца достаточно для заполнения 12—15 пробирок. Затем в пробирки прибавляется по 8 куб. сант. физиологического раствора хлористого натрия; в таком виде пробирки стерилизуются в автоклаве при 120°C. в течение 15 минут. Остается теперь добавить всюду по 4 куб. сант. ненагретой лошадиной сыворотки, и среда готова для посева. На приготовленной таким образом питательной среде мне удалось по-

лучить с первого же раза очень богатую культуру спирохет Obermeiera. Достаточно посеять 1—2 капли крови больного, чтобы через несколько дней при температуре 37°C. получить богатую культуру,—когда при рассматривании капли питательной среды под микроскопом в поле зрения видно 30—40 спирохет, а иногда и больше. Генерации полученных из крови человека спирохет удаются легко, и в настоящее время я имею в лаборатории 19-ю генерацию первого штамма, выкультивированного из крови больного два месяца тому назад. Развитие культуры идет быстрее, чем это описывают Nogouchi и Nata. Обычно максимум роста достигается на 4—5 день. В культуре можно видеть формы спирохет, отличающиеся по длине и взаимному расположению: наряду с очень короткими спирохетами встречаются экземпляры, по крайней мере в 10 раз превышающие их по длине; большую часть спирохеты располагаются отдельно одна от другой, но вместе с тем можно видеть и аггломераты спирохет, состоящие из 5—6 особей, образующих очень красивые фигуры звезд с расходящимися в разные стороны лучами; иногда можно бывает отметить, как две спирохеты, большую часть длиннее, перевиваются, переплетаются одна вокруг другой по длиннику; встречаются, наконец, фигуры, которые проще всего трактовать, как явление поперечного деления спирохет, и которые характеризуются тем, что две спирохеты, большую часть короче и находящиеся в оживленном движении, соединены между собою тоненьким, едва заметным мостиком, имеющим вид очень нежной нити. Нужно отметить, что в зависимости от периода развития спирохет в культуре преобладают те или другие формы. Длинные спирохеты, звездообразные фигуры и перевивающиеся формы появляются в культуре в первые дни роста; наоборот, для периода максимума роста является характерным как бы наводнение культуры мелкими формами спирохет, придающими картине однообразный вид. (См. прилагаемые рисунки).

По достижении максимума роста, обычно в течение следующих суток или даже быстрее, картина резко меняется: в течение этого времени от богатого населения культуры остаются лишь жалкие остатки в виде отдельно плавающих в жидкости, большую часть неподвижных спирохет, и, лишь как исключение, можно изредка встретить подвижные формы. Если же по достижении максимума роста культуры переносятся из термостата в прохладное место и содержатся дальше при температуре 5—7°C., то при таких условиях спирохеты сохраняются в жизнеспособном состоянии



## Приложение к статье В. М. Аристовского.

„О культивировании спирохеты Obermeier'a“  
Культура спирохеты Obermeier'a на среде с куриным  
белком.

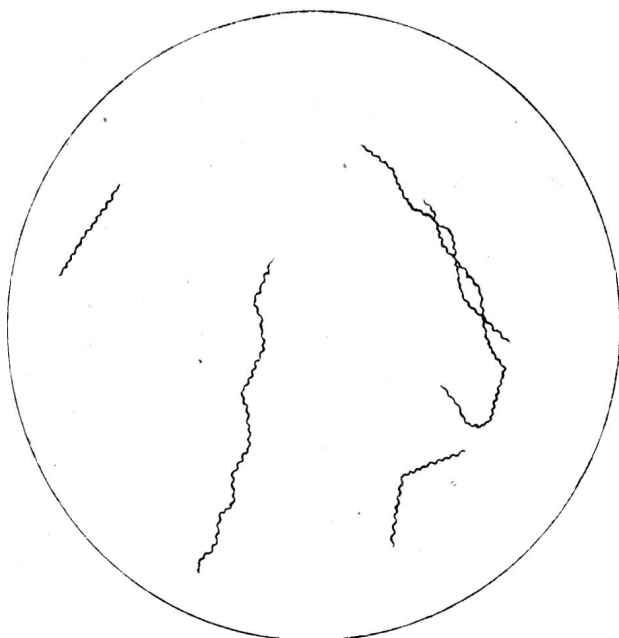


Рис. 1. 24-х часовая культура.

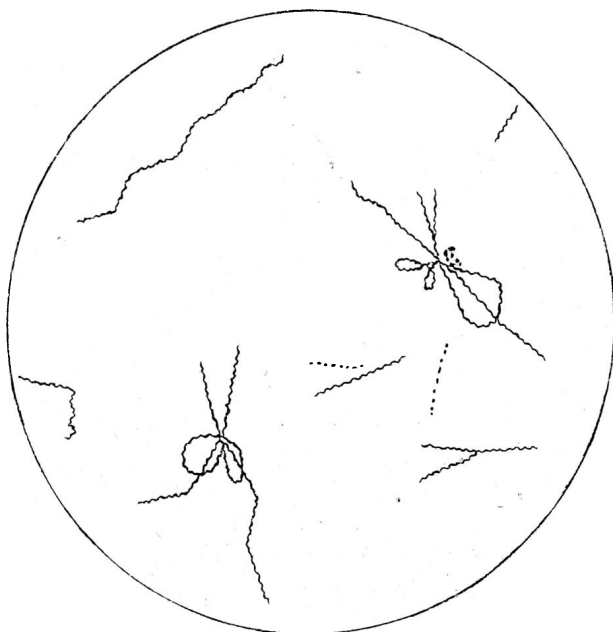


Рис. 2. 2-х суточная культура.

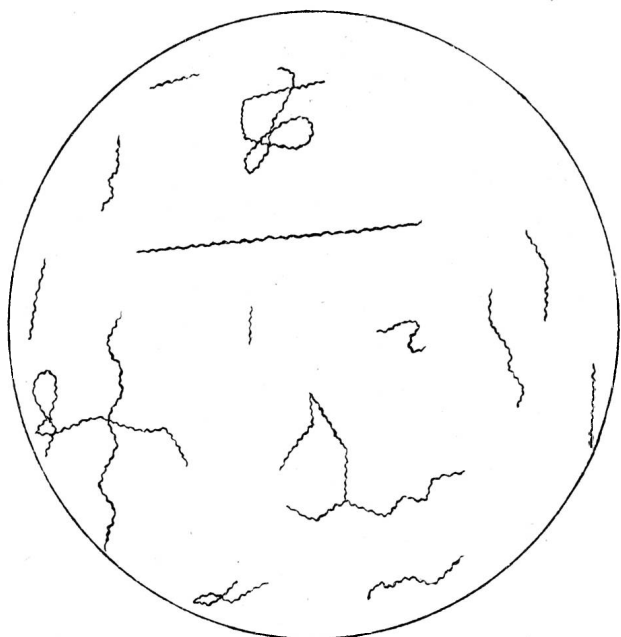


Рис. 3. 3-х суточная культура.

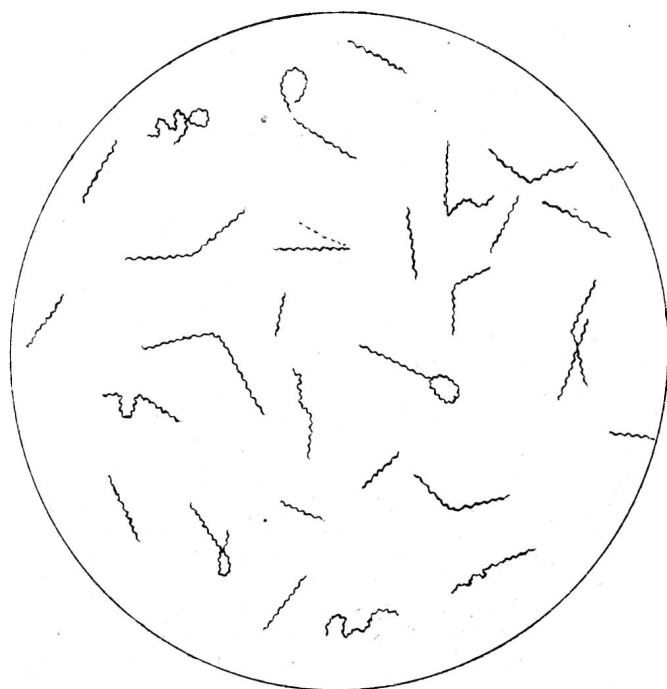


Рис. 4. 4-х суточная культура.

очень продолжительное время. Я еще не имею возможности точно указать продолжительность сохранения культур в жизнеспособном состоянии, так как этот вопрос систематически мною не разработан до настоящего времени; однако имеются уже наблюдения, что в сохраняемых в течение месяца при низкой температуре культурах спирохеты, хотя и уменьшаются в числе, по все же при рассматривании под микроскопом в каждом поле зрения можно видеть 1—2 подвижных спирохеты. Посевы из таких культур на новые питательные среды всегда дают положительный результат, причем развитие культуры идет обычным порядком. Ясно, что культуры спирохет при таких условиях могут сохраняться и более продолжительное время, чем один месяц, так как, несомненно, гибель спирохет в культуре происходит лишь очень медленно, если, спустя еще месяц, можно бывает видеть в каждом поле зрения 1—2 подвижных спирохеты.

Таким образом, предлагаемая мной методика выращивания в пробирках спирохеты *Obermeiera* крайне проста и в то же время безусловно надежна. Имея в руках верный метод получения богатых культур спирохеты, мы получаем в то же время возможность пересмотреть заново целый ряд вопросов, связанных с морфологией и биологией спирохет, а также вопросов иммунитета при возвратном тифе. В настоящее время мной приступлено уже к получению иммунной сыворотки от кролика. Было-бы удобнее, конечно, пользоваться для иммунизации не кроликом, а лошадью, имея в виду состав питательной среды, куда входит, как составная часть, лошадиная сыворотка, против белков которой будут также появляться противотела в случае иммунизации кролика. А это обстоятельство, конечно, может значительно осложнить дело и затемнить картину и без того сложных реакций иммунитета. Выход из этого положения, однако, есть, и очень простой. Я заменил в своей питательной среде сыворотку лошади инактивированной при 56°C. сывороткой кролика и получил при этом также богатую культуру спирохет. Для получения прививочного материала в настоящее время я пользуюсь средой следующего состава: физиолог. раствора хлорист. натрия 8 куб. сант. инактивированной сыворотки кролика—2,5 куб. сант. и кусочки свернутого белка из куриного яйца.

Наряду с этим мной делаются попытки подойти ближе к разрешению вопросов, связанных с морфологией, историей развития и физиологией спирохет вообще и спирохеты *Obermeiera* в частности.