Из Бактериологического Института Казанского Университета.

О некоторых особенностях культивирования спирохэт Обермейера.

(Сообщено в Обществе Врачей при Казанском Университете).

Проф. В. М. Аристовского и д-ра Н. Н. Благовещенского.

После открытия Schaudinn'ом, в 1905 году, возбудителя сифилиса, естественным образом живой интерес среди бактериологов возбудил вопрос о культивировании этой спирохэты. Однако те затруднения, которые встретились на пути первых исследователей (Volpino и Fontana, Levaditi и Mc Intosh, Schereschewsky, Hoffmann) при решении этой задачи, заставили поставить на очередь вопрос о культивировании спирохэт вообще. Поэтому не простой случайностью является то обстоятельство, что первая чистая культура спирохэт (Spir. dentium) была получена Mühlens'ом в 1906-м году, т. е. уже спустя год после открытия бледной спирохэты. Впрочем смешанные культуры спирохэт (т. н. Mischkultur) были получены еще раньше—Goadby в 1903 г., Veszpémi, Walver'ом и Funnicliff'ом, Müller'ом и Scherber'ом в 1905 г. В 1909 году Schereschewsky получил бледную спирохэту в смешанной с другими бактериями культуре, и в том же году Mühlens, а год спустя Hoffmann заявили о получении ими чистой культуры этой спирохэты.

Начиная с 1911 г. стали появляться весьма ценные работы Noguchi, посвященные вопросу о культивировании спирохэт вообще, и ему удалось, при помощи выработанной им методики, культивировать почти все виды спирохэт. О получении чистых культур бледной спирохэты после 1911 г. сообщают также Shamaine, Sowade, Arnheim, Tomasczewsky, Proca, Danila и Stroe, Schereschewsky, Baeslack. Последние авторы не вносят впрочем ничего нового в методику культивирования, и дальнейшим шагом вперед в смысле разработки и упрощения этой методики нужно считать исследования Ungermann'a (1916 и 1918 г.), который применил для культивирования

Spir. Weil'евской болезни, Spir. gallinarum, Spir. Duttoni и Обермейеровской инактивированную сыворотку морской свинки и кролика.

Судя по этой краткой исторической справке, можно было-бы думать, что вопрос о культивировании спирохэт разрешен благополучно. С теоретической точки зрения это, быть может, и правильно, но с практической—дело обстоит далеко нестоль блестяще, в особенности, что касается культивирования наиболее важных для врача патогенных спирохэт,—бледной спирохэты и спирохэты Обермейера. Для иллюстрации положения дела достаточно указать на то, напр., обстоятельство, что столь авторитетный исследователь, как Noguchi, полагает, что ни Mühlens, ни Hoffmann не имели в своих руках культуры бледной спирохэты, а то, что эти авторы считали за бледную спирохэту, была морфологически идентичная с сифилитической спирохэтой Treponema dentium. Основание для такого утверждения Noguchi видит в том, что культуры Mühlens'a и Hoffmann'a издали интенсивный запах, чего не наблюдал Noguchi в своих культурах; кроме того, по Noguchi, бледная спирохэта растет только при непременном присутствии в пробирке с питательной средой свежего кусочка органа или ткани, тогда как Mühlens и Hoffmann обходились своих опытах без этого. С другой стороны Mühlens, являющийся также большим авторитетом в вопросе культивирования спирохэт, путем многочисленных опытов убедился, что культивирование по Noguchi вовсе не так просто, как это может показаться при чтении работ этого автора: Mühlens'y до сих пор не посчастливилось получить по этому способу ни культуры бледной спирохэты, ни культуры спирохэты Обермейера. В другом месте Mühlens пишет, что ни Mühlens—Hoffmann'овская методика, ни методика Noguchi не сделались общим достоянием бактериологов из-за своей сложности и ненадежности. Таким образом наиболее авторитетные исследователи по вопросу о культивировании спирохэт, какими являются Mühlens и Noguchi, в значительной мере сами же развенчивают ими же созданную методику.

Так как нас интересует главным образом вопрос о культивировании Spir. Obermeieri, то мы считаем нужным несколько детальнее осветить положение дел в этом частном случае. Кроме упомянутого выше метода Noguchi, в литературе описаны еще метод Hata, метод Ungermann'a и, наконец, метод, предложенный одним из нас в 1920 г.

Оценка метода Hata, на основании собственных наблюдений, была уже приведена в нашей работе „О культивировании спирохэт Обермейера“ (Каз. Мед. Ж., 1921, № 1).

Методика Noguchi также неудовлетворительна, как это видно из приведенных выше указаний Mühlens'a, и как было заявлено нами в только что указанной работе. Из литературы нам известен только один случай более или менее удачного применения этой методики. Автором, применившим с некоторым успехом методику Noguchi, был Plotz, которому удалось, в Сербии, в 1917 г., непосредственно из крови человека[1]) вырастить спир. Обермейера в 5 генерациях,—результаты, которые едва-ли кого-нибудь могут удовлетворить в настоящее время.

Что касается, наконец, методики Ungermann'a, то прежде всего считаем долгом отметить, что мы с ней знакомы по двум источникам, которые, к сожалению, описывают ее неодинаково. Эта методика была разработана в 1916—1918 г. г., т. е. в то время, когда русские ученые были изолированы от культурного Запада; поэтому неудивительно, что первые сведения о методике Ungermann'a мы получили только осенью 1921 года, да и то по реферату, помещенному в № 19 Münch. med. Woch. за 1921 год. Судя по этому реферату, Ungermann культивирует спирохэт Обермейера на инактивированной сыворотке возможно молодого животного (какого,—в реферате не сказано). Другим источником, откуда нам удалось получить сведения о методике Ungermann'a, является статья проф. Mühlens'a „Metoden der Spirochetenzüchtung“ в Handbuch d. mikrobiol. Technik Kraus—Levaditi, любезно предоставленная нам автором в бытность его в Казани зимой текущего года[2]). По Mühlens'y среда Ungermann'a представляет из себя инактивированную сыворотку кролика, к которой после инактивирования прибавлено небольшое количество свежей ненагретой сыворотки кролика же или мыши; пробирка со средой заливается парафиновым маслом; выращивание ведется при t° в 30°—37° C. Mühlens заявил по поводу методики Ungermann'a, что, хотя выращивание на кроличьей инактивированной сыворотке приближает нас к разрешению проблемы культивирования

---

[1]) Сам Noguchi применял свой метод не у постели больного человека, а посевным материалом ему служила кровь инфицированного животного, что, разумеется, не одно и тоже.

[2]) Пользуемся здесь приятным случаем принести за это проф. Mühlens'y нашу искреннюю благодарность.

некоторых видов спирохэт, но по отношению к спирохэтам возвратного тифа, по личным опытам, могут встретиться еще большие затруднения. Со своей стороны, как только нам стала известна методика Ungermann'a, мы также сделали попытку культивировать спирохэт Обермейера по Ungermann'y, но получили отрицательный результат.

Со времени получения нами первых удачных результатов по культивированию спирохэт Обермейера помощью нашего оригинального метода, т. е. с начала 1920 г., мы не прекращали работать по этому вопросу. Правда, в силу неблагоприятных, а по временам—и совершенно невыносимых условий лабораторной жизни, наша работа шла с перерывами, продолжавшимися иногда месяцами. Эти невольные перерывы привели к тому, что мы были вынуждены изменить намеченный нами в первой нашей статье план работы и отложить решение поставленных нами себе задач до более благоприятного времени. В настоящей статье мы решаемся все же сообщить тот, хотя бы подчас разрозненный материал, который накопился у нас в течении 2-летней работы и который связан, главным образом, с методикой культивирования, надеясь, что и этот материал представляет некоторый интерес в виду той трудности и капризности, с которой связано культивирование спирохэт вообще и спирохэты Обермейера в частности.

В своей работе мы пользовались двумя питательными средами, о которых сообщалось нами в первой статье: среда № 1 состоит из 8 к. с. физиолог. раствора NaCl, 4 к. с. свежей лошадиной сыворотки и небольшого кусочка сгустка крови лошади или человека; среда № 2 состоит из 8 к. с. физиол. раствора NaCl, 4 к. с. свежей лошадиной сыворотки и кусочка свернутого белка куриного яйца.

Прежде всего считаем нужным сообщить о некоторых изменениях в технике приготовления питательных сред. Опыт убедил нас, что стерилизация пробирок с кусочками белка должна производиться путем 2- или 3- кратного нагревания до 100°С. в течение 15—20 минут, а не однократного при 115°—120°, как это указывалось в нашей первой работе. Оказывается, что иногда нагревание до 115°—120° так изменяет белок, что он становится негодным для получения хорошей питательной среды. Это изменение белка под влиянием нагревания иной раз можно подметить по появляющейся при этом легкой желтовато-бурой окраске как самых кусочков белка, так и физиологического раствора соли, в котором они находятся. Измененный таким образом белок употреблять для приготовления питательной среды

Оценка метода Hata, на основании собственных наблюдений, была уже приведена в нашей работе „О культивировании спирохэт Обермейера“ (Каз. Мед. Ж., 1921, № 1).

Методика Noguchi также неудовлетворительна, как это видно из приведенных выше указаний Mühlens'a, и как было заявлено нами в только что указанной работе. Из литературы нам известен только один случай более или менее удачного применения этой методики. Автором, применившим с некоторым успехом методику Noguchi, был Plotz, которому удалось, в Сербии, в 1917 г., непосредственно из крови человека[1]) вырастить спир. Обермейера в 5 генерациях,—результаты, которые едва-ли кого-нибудь могут удовлетворить в настоящее время.

Что касается, наконец, методики Ungermann'a, то прежде всего считаем долгом отметить, что мы с ней знакомы по двум источникам, которые, к сожалению, описывают ее неодинаково. Эта методика была разработана в 1916—1918 г. г., т. е. в то время, когда русские ученые были изолированы от культурного Запада; поэтому неудивительно, что первые сведения о методике Ungermann'a мы получили только осенью 1921 года, да и то по реферату, помещенному в № 19 Münch. med. Woch. за 1921 год. Судя по этому реферату, Ungermann культивирует спирохэт Обермейера на инактивированной сыворотке возможно молодого животного (какого,—в реферате не сказано). Другим источником, откуда нам удалось получить сведения о методике Ungermann'a, является статья проф. Mühlens'a „Metoden der Spirochetenzüchtung“ в Handbuch d. mikrobiol. Technik Kraus—Levaditi, любезно предоставленная нам автором в бытность его в Казани зимой текущего года[2]). По Mühlens'y среда Ungermann'a представляет из себя инактивированную сыворотку кролика, к которой после инактивирования прибавлено небольшое количество свежей ненагретой сыворотки кролика же или мыши; пробирка со средой заливается парафиновым маслом; выращивание ведется при t° в 30°—37° C. Mühlens заявил по поводу методики Ungermann'a, что, хотя выращивание на кроличьей инактивированной сыворотке приближает нас к разрешению проблемы культивирования

---

[1]) Сам Noguchi применял свой метод не у постели больного человека, а посевным материалом ему служила кровь инфицированного животного, что, разумеется, не одно и тоже.

[2]) Пользуемся здесь приятным случаем принести за это проф. Mühlens'y нашу искреннюю благодарность.

некоторых видов спирохэт, но по отношению к спирохэтам возвратного тифа, по личным опытам, могут встретиться еще большие затруднения. Со своей стороны, как только нам стала известна методика Ungermann'a, мы также сделали попытку культивировать спирохэт Обермейера по Ungermann'y, но получили отрицательный результат.

Со времени получения нами первых удачных результатов по культивированию спирохэт Обермейера помощью нашего оригинального метода, т. е. с начала 1920 г., мы не прекращали работать по этому вопросу. Правда, в силу неблагоприятных, а по временам—и совершенно невыносимых условий лабораторной жизни, наша работа шла с перерывами, продолжавшимися иногда месяцами. Эти невольные перерывы привели к тому, что мы были вынуждены изменить намеченный нами в первой нашей статье план работы и отложить решение поставленных нами себе задач до более благоприятного времени. В настоящей статье мы решаемся все же сообщить тот, хотя бы подчас разрозненный материал, который накопился у нас в течении 2-летней работы и который связан, главным образом, с методикой культивирования, надеясь, что и этот материал представляет некоторый интерес в виду той трудности и капризности, с которой связано культивирование спирохэт вообще и спирохэты Обермейера в частности.

В своей работе мы пользовались двумя питательными средами, о которых сообщалось нами в первой статье: среда № 1 состоит из 8 к. с. физиолог. раствора NaCl, 4 к. с. свежей лошадиной сыворотки и небольшого кусочка сгустка крови лошади или человека; среда № 2 состоит из 8 к. с. физиол. раствора NaCl, 4 к. с. свежей лошадиной сыворотки и кусочка свернутого белка куриного яйца.

Прежде всего считаем нужным сообщить о некоторых изменениях в технике приготовления питательных сред. Опыт убедил нас, что стерилизация пробирок с кусочками белка должна производиться путем 2- или 3- кратного нагревания до 100°С. в течение 15—20 минут, а не однократного при 115°—120°, как это указывалось в нашей первой работе. Оказывается, что иногда нагревание до 115°—120° так изменяет белок, что он становится негодным для получения хорошей питательной среды. Это изменение белка под влиянием нагревания иной раз можно подметить по появляющейся при этом легкой желтовато-бурой окраске как самых кусочков белка, так и физиологического раствора соли, в котором они находятся. Измененный таким образом белок употреблять для приготовления питательной среды

ни в каком случае не следует. Второе обстоятельство, на которое мы обращаем внимание, касается лошадиной сыворотки. Сыворотка прежде всего должна быть свежая (не старше 3—4 дней), старыми лошадьми для добывания сыворотки пользоваться не следует; затем, сыворотка не должна быть жирной, почему с вечера накануне того дня, когда берется кровь у лошади, последняя не должна получать корма; наконец, что касается сгустков крови, то они не должны быть старше 3-дневного возраста, при условии хранения их в прохладном месте. Соблюдение этих условий является совершенно необходимым для получения годной питательной среды—тем более, что выполнение их неслишком осложняет дело.

Далее, мы хотели-бы обратить внимание на температурные условия, при которых происходит культивирование спирохэт, и значение которых было недостаточно подчеркнуто в первой нашей статье. Температурный optimum для культур спирохэт Обермейера лежит в пределах между 34,5° и 35,5° С.

Переходя теперь к моменту получения культуры из крови больного, мы должны прежде всего заявить, что для положительного результата далеко небезразлично, в который день берется кровь для посева, богатство крови спирохэтами не имеет при этом решающего значения, как в этом мы убедились на многочисленных опытах; в отдельных случаях кровь, очень богатая спирохэтами, дает отрицательный результат, тогда как бедная может служить прекрасным материалом для получения богатой культуры. Если, таким образом, богатство крови спирохэтами не имеет решающего значеня, то можно было-бы расчитывать найти ключ к разгадке в морфологических особенностях спирохэт. До сих пор, однако, чего-нибудь поучительного в этом смысле подметить мы не могли. Мы можем лишь сказать, что кровь, взятая от больного во второй половине приступа, является гораздо более надежным материалом, чем взятая в первые дни приступа. Для решения вопроса о значении времени взятия крови от больного в тот или другой день приступа нами был поставлен ряд опытов, когда кровь от больного засевалась на наши питательные среды ежедневно, начиная с первого дня приступа. Обычно дело шло о втором приступе, так как, по понятным причинам, мы не имели возможности наблюдать больных с первого дня первого приступа. Для иллюстрации полученных результатов остановимся на одном наиболее демонстративном случае.

У больного возвратным тифом, начиная с первого дня второго приступа, из локтевой вены забиралась кровь и засевалась ежедневно

в пробирки с первой и второй питательной средой по три капли. Посевы крови на 1-й, 2-й, 3-й и 4-й дни дали отрицательный результат, посевы же крови на 5-й день приступа, накануне кризиса, дали богатую культуру спирохэт на той и другой питательной среде.

Мы не знаем причины этого явления, но полагаем, что ставить отрицательный результат посевов в зависимость от бактерицидных свойств крови больного нельзя, так как наши наблюдения убеждают нас, что неудачный исход дела наблюдается чаще всего при посеве крови первых дней приступа, когда бактерицидность крови ниже, чем к концу приступа. Мы думаем, что дело здесь не в бактерицидных свойствах крови, а в самих спирохэтах.

Считаем нужным указать еще на одно наблюдение, подмеченное нами при посевах крови. Обычно в случае удачного посева культура спирохэт получается и на первой, и на второй из наших питательных сред. Однако в некоторых случаях мы наблюдали и другое явление, а именно, на одной из питательных сред культура развивается значительно пышнее, чем на другой, или же на последней совсем не получается. Поэтому мы рекомендуем при пользовании нашей методикой производить посевы крови одновременно как на первой, так и на второй питательной среде. Мы обращаем внимание на эту зависимость результатов посева крови от времени взятия ее от больного еще и потому, что, быть может, этим обстоятельством об'ясняется до известной степени то противоречие, которое отмечается в литературе при оценке того или другого метода культивирования, когда в руках различных исследователей один и тот же метод давал слишком неодинаковые результаты.

Получением культуры спирохэт в пробирке из исходного материала далеко еще не исчерпывается задача того или другого метода культивирования. Получение первой культуры—только полдела. Впереди остается еще сложная задача получения последующих генераций. Ценность и практическая пригодность методики в значительной мере зависят от удачного разрешения этой второй задачи. И по отношению к нашей методике в том виде, как она дана в первой нашей статье, мы должны сознаться, что дело обстоит здесь сложнее, чем нам казалось при первых опытах. Работая в течение двух лет с нашими культурами, мы сумели, как нам кажется, изменив нашу первоначальную методику, добиться удовлетворительных результатов. Сущность наших изменений основана на двух фактах, с которыми мы отчасти познакомились уже при описании способа получения культуры спирохэт из крови больного:

первый факт—это зависимость результатов посева крови от периода болезни, а второй — наклонность спирохэт в различных случаях расти то на первой, то на второй питательной среде. Эти особенности в еще более резкой степени присущи и отдельным генерациям спирохэт.

Что касается первой особенности, то при получении генераций вопрос практически сводится к определению того момента, в зависимости от возраста культуры, когда следует делать пересев на новую питательную среду. Наши наблюдения убедили нас, что точно указать определенный в этом отношении момент для всех последующих генераций—нельзя. Подобно тому, как при посеве крови больного мы могли лишь подметить, что вторая половина приступа является наиболее подходящим моментом для удачного посева, так и при получении отдельных генераций мы можем отметить, что наибольшее количество шансов на успех совпадает с 2- или 3- дневным возрастом культуры и очень редко—с 4-дневным. Если принять во внимание, что продолжительность жизни спирохэт в культуре при 35°С до момента появления ясных признаков обратного развития равняется в большинстве случаев 3 дням для культур на первой среде и 4 дням—на второй, то невольно хочется видеть здесь аналогию с тем, что мы наблюдаем и при посевах крови больного. Можем, далее, отметить, что богатство культуры спирохэтами решающего значения здесь также не имеет, как это отмечалось нами и при посевах крови. Аналогия, следовательно, идет и дальше. Поэтому мы склонны думать, что дело здесь сводится к какому-то особенному состоянию спирохэт, связанному, быть может, с ближе неизвестной нам историей развития этого паразита. Как-бы то ни было, но для удачного культивирования спирохэт является крайне важным делать посевы своевременно. У отдельных генераций момент этот, как то было указано выше, совпадает с 3- дневным возрастом, у других—с 2-дневным и очень редко—с 4-дневным, причем предвидеть этот момент у отдельных генераций—мы не в состоянии. Поэтому остается только один выход из положения,—это производить пересевы культур и на 2-й, и на 3-й, и на 4-й день, не смущаясь тем обстоятельством, что удачный результат будет только в одном, быть может, из этих трех случаев. Это обстоятельство осложняет дело, но, пока мы не знаем сущности последнего, приходится идти ощупью.

Вторым моментом, придающим своеобразный отпечаток нашей методике, является то обстоятельство, что различные поколения спи-

рохэт обладают избирательной способностью развиваться на одной только из 2 наших питательных сред. Это свойство у отдельных генераций бывает выражено чрезвычайно резко, причем, если проследить его в последовательном ряде генераций, то можно отметить некоторую закономерность в чередовании питательных сред; фактически дело сводится к тому, что определенная генерация, дав несколько поколений, напр., на среде с кровяным сгустком, теряет способность давать богатые, а потом и вообще какие-бы то ни было культуры на этой среде и одновременно приобретает способность развиваться на среде с кусочком белка куриного яйца,—способность, которая в последующих поколениях сменяется снова первоначальным состоянием. Это приводит к тому, что получить длинный ряд генераций, пользуясь только одной питательной средой (первой или второй),—не удается. Наибольшее количество генераций при исключительном пользовании только одной питательной средой равнялось в наших отытах—16, причем в это число входят и поколения с ясными признаками начинающегося вырождения культуры; если исключить эти поколения из общего числа и ограничиться только счетом богатых спирохэтами генераций, то это число не превышало 11. Поэтому для успеха дела в нашу первоначальную методику мы вынуждены были внести еще новый корректив. Рядом наблюдений мы установили, что, проведя несколько поколений на первой питательной среде (обычно 2—3), можно уже бывает отметить наступающую у культуры наклонность лучше развиваться на среде с белком куриного яйца; тогда достаточно обычно провести только одну генерацию через вторую питательную среду, чтобы вновь сообщить культуре способность развиваться на среде со сгустком. Практически дело сводится к тому, что мы при выращивании генераций придерживаемся такой схемы: 1) каждая культура спирохэт (на первой или на второй питательной среде), раз она не имеет ясных признаков вырождения, подлежит пересеву на новую питательную среду по достижении 2-дневного, 3-дневного и 4-дневного возраста; 2) из культур на среде со сгустком пересев делается как на первую, так и на вторую питательную среду; 3) из культур на среде с куриным белком пересев делается только на среду с кровяным сгустком.

Пользуясь этой схемой, мы в настоящее время довели выделенный нами в конце февраля текущаго года (т. е. в течение 2 месяцев) штамм до 30 генераций. Схематически родословная этого штамма представится в следующем виде:

$$С_2—С_3—С_2—Б_3—С_3—С_2—С_2—Б_3—С_2—Б_2—С_2—Б_2—Б_3—С_3$$
$$Б_3—С_3—С_2—С_3—Б_3—С_3—С_3—С_3—Б_2—С_3—С_4—Б_2—С_3—С_3—$$
$$С_2—Б$$

Буква С обозначает среду с кровяным сгустком, буква Б—среду с белком куриного яйца, цифры—возраст культуры, когда из нее делался пересев для получения следующей генерации.

В культурах последней, т. е. 30-й, полученной нами, генерации мы не отмечаем ни обеднения спирохэтами, ни каких-либо изменений морфологического характера, свидетельствующих о вырождении культуры; поэтому мы надеемся, что дело выращивания дальнейших поколений этого штамма найдет без помехи и дальше.

Если принять во внимание, что Noguchi при помощи своего метода получил лишь 9 генераций спирохэт Обермейера на протяжении $^1/_2$-года, а Plotz при помощи этого же метода получил всего 5 генераций, то мы имеем, как нам кажется, основание утверждать, что на стороне нашего метода—явное преимущество.

За время, прошедшее с момента нашего доклада до появления настоящей работы в печати (около $^1/_2$-года), мы продолжали выращивание дальнейших поколений того штамма спирохэт, о котором здесь идет речь, и в настоящее время мы имеем в лаборатории 122-ю генерацию. Это дает нам полную уверенность утверждать, что культивирование спирохэт Обермейера по нашему методу может производится в безконечном числе генераций.