Отдел I. Клиническая и экспериментальная медицина.

Из Кр. Микробиологического института Т.Н.К.З. (Директор д-р С. Ф. Немшилов, научный руководитель проф. В. М. Аристовский) и кафедры Микробиологического Казанского государств. медицинского института (зав. кафедрой проф. В. М. Аристовский).

К методике культивирования spiroch. pallida.

Прив.-доц. **Р. Р. Гельтцера**.

В связи с необходимостью изучения иммунобиологических свойств sp. pallida, приготовления антигенов из этих спирохэт для практических целей перед нами возник вопрос о получении массовых культур sp. pallida. Для получения таких к-р должна быть, с одной стороны, по возможности упрощена методика выращивания, а с другой – применяемые питательные среды не должны содержать кусочков органов, легко распадающихся и переходящих в осадок при центрофугировании. Освобождение культур от этих частиц путем отстаивания и сливания сопряжено с потерей большого количества материала. В этом отношении имело бы большое значение выращивание sp. pallida или с кусочками таких органов, которые не давали бы помутнения среды, или выращивание без добавления кусочков животной ткани. Что касается первой возможности, то, несмотря на прибавление к питательному бульону кусочков таких сравнительно трудно разрыхляющихся органов, как сердце или легкое,— среда все же мутнеет, и таким образом при центрофугировании в осадке накапливаются мельчайшие частицы этих органов. Относительно развития спирохэт нужно сказать, что на такого рода средах, состоящих из одного бульона из конины, pH = 7,6, с прибавлением кусочков мышцы сердца или легкого, к-ры развиваются хорошо, но все же развитие наступает несколько медленнее и количество спирохэт меньше, чем на обычно нами применяемой среде с кусочками печени быка.

Вопрос о возможности выращивания sp. pallida на средах без прибавления кусочков животной ткани как будто разрешился методом Врублевского, который для культивирования ряда анаэробов, в том числе и бледной спирохэты, заменил животную ткань кусочками ваты, являющейся прекрасным адсорбентом кислорода. Эта методика дала хорошие результаты и в проверочных опытах Глотовой и Вахмистровой, испытавших ее при выращивании 13 основных штаммов анаэробных бацилл. В этих опытах авторы на „ватной“ среде при доступе воздуха (пробирки закрывались обыкновенными ватными пробками) получали хороший рост в первые же сутки. С другой стороны, мы имеем опыты Hoder'a с выращиванием sp. pallida (шт. Krob) на бульоне, pH = 7,6, с 10% кроличьей сыворотки. На таком сывороточном бульоне без добавления кусочков органов спирохэты развиваются и в некоторых случаях обильно, но такая среда все же не может заменить питательную среду с кусочками органов, так как получаемые результаты незакономерны и последующие генерации (2 и 3) не всегда удаются.

Для получения к-р. sp. pallida, свободных от примеси мельчайших частиц органов, нами были предприняты опыты выращивания sp. pallida наших I и II штаммов и шт. Reiter'a по методу Врублевского и на сывороточном бульоне по Hoder'y. До этого, однако, нами были поставлены сравнительные опыты выращивания sp. pallida на жидких средах с кусочками печени, в которых применялся различный питательный бульон, т. е.: наряду с основной питательной средой с бульоном из конины с 1% пептона Witte были применены среды из бульона на бычьем мясе с прибавлением 1% пептона „фармакон" и из бульона Готтингера (разведение 1:2). Во всех этих опытах бульон применялся с pH = 7,6; стерилизация втечение $^1/_2$ часа при 110°. Выращивание производилось под слоем вазелина при 35° втечение 7 дней. Эти опыты показали, что среда с мясопептонным бульоном из бычьего мяса и пептоном „фармакон" несколько уступает основной среде с бульоном из конины с 1% пептона Witte и среде с бульоном Готтингера. В отношении ценности бульона нужно отметить, что бульон по Готтингеру может вполне заменить до сих пор нами применяемый бульон из конины с 1% пептона Witte. Подвижность спирохэт, как мы в этом убедились на бессчисленном ряде опытов, является даже энергичнее и сохраняется дольше при хранении к-р при комнатной t°, чем на обычной среде. Итак, в результате этих опытов мы теперь для поддержания культур наших штаммов I и II и шт. Reiter'a, а также для получения, что особенно важно, массовых культур применяем питательную среду, состоящую из бульона Готтингера (1:2), pH = 7,6, с прибавлением кусочков печени быка.

Опыты с „ватной" средой.

В качестве питательной среды мы применяли бульон из конины с 1% пептона Witte, pH = 7,6, и бульон Готтингера (1:2) с прибавлением 0,1—0,2 гр. гигроскопической ваты на 8,0 куб. с. бульона; стерилизация при 110° $^1/_2$ часа. С имеющимися у нас в лаборатории тремя штаммами sp. pallida первоначально были поставлены 3 серии опытов: выращивание спирохэт под слоем вазелина, жидкого парафина и без заливки, т. е. при полном доступе воздуха. Выращивание производилось при 35°—37°, исследование в „Dunkelfeld" на 5,10 и 14 день. Результаты этих опытов представлены в нижеследующей таблице.

	I.	II	R
Ватная среда с заливкой вазелином	3—5	5—7	1—2
„ „ „ жидк. парафин.	0	0	0
„ „ при доступе воздуха	0	0	0

обозначения: первые цифры указывают—число спирохэт.
вторые цифры—число полей зрения
0 = спирохэты не обнаружены
R = шт. Reiter'a.

Подвижность спирохэт слабая; в таблице указано максимально число спирохэт, наблюдавшееся в поле зрения, причем материал для исследования брался в данном случае со дна пробирки; при взятии же из более высоких слоев нередко спирохэты не могли быть обнаружены в целом ряде полей зрения. При повторении опытов мы получали или те же результаты, или даже худшие, т. е. спирохэты развивались настолько

скудно, что могли быть определяемы при микроскопии далеко не в каждом поле зрения.

Таким образом, этот метод выращивания на оригинальной „ватной" среде в отношении наших штаммов и шт. R оказался совершенно непригодным. Повидимому, хотя анаэробные условия и создаются, но они или для развития спирохэт оказываются недостаточными, или же такая питательная среда является неполноценной в отношении необходимых для развития спирохэт питательных веществ. При добавлении к бульону кусочков печени, несомненно, получаемый при стерилизации отвар печени играет роль питательного вещества, так как в поставленных нами опытах для изучения значения кусочков печени выяснилось, что если к физиологическому раствору NaCl прибавить кусочки печени и простерилизовать обычным путем, то на такой крайне упрощенной питательной среде под слоем вазелина спирохэты развивались довольно пышно с тем только отличием, что максимум развития наступал не на 7 день, как это наблюдается при нашем обычном методе культивирования, а на 12—15 день; затем, быстрее наступало обратное развитие (неподвижные формы, распад). При попытках получения ряда генераций на этой упрощенной среде при последующих пересевах к-ры развивались все медленнее и медленнее, и таким образом для длительного культивирования эти среды оказались непригодными. Но из этих опытов можно сделать вывод, что печень, кроме выполнения адсорбента кислорода, имеет еще значение как питательное вещество и при этом весьма ценное для развития спирохэт. В связи с этим нами были поставлены опыты выращивания спирохэт: 1) на „ватной" среде с заменой бульона из конины нашим печеночным (1 ч. размельченной печени быка + 4 ч. физиологического раствора NaCl, кипячение $^1/_2$ часа и фильтрование; pH = 7,6) и 2) на жидкой среде, состоящей из бульона из конины или по Готтинбергу с кусочками печени, но с удалением после стерилизации кусочков печени (фильтрование через бумажный фильтр) и с заменой их ватой (последующая стерилизация также при 110°—$^1/_2$ ч.). Результаты этих опытов тоже получились отрицательные. Отсюда мы заключили, что роль кусочка печени является, повидимому, более сложной.

С другой стороны, зная из наблюдений Hoder'a, что спирохэты могут развиваться (правда, невсегда обильно) на бульоне с 10% кроличьей сыворотки без прибавления кусочков органа, мы составили питательную среду таким образом, что к „ватной" среде добавили 10% кроличьей сыворотки, нагретой втечение 1 часа при 60°, и при выращивании на такой среде получили очень хорошие результаты. На этой среде под слоем вазелина уже на 7—10 день можно было определить бесчисленное множество спирохэт, а при взятии материала со дна мы имели сплошную массу спирохэт, причем макроскопически среда оказывалась помутневшей и наиболее интенсивно в области комка ваты, а на дне находился беловатого цвета осадок, сплошь состоящий из спирохэт. Жизнеспособность таких к-р сохранялась при 35° не менее 40 дней (дальнейшие наблюдения не были произведены). Таким образом применяя эту „ватную среду" с добавлением кроличьей сыворотки мы получили такие же результаты, как и при выращивании с кусочками печени, но в этом случае, хотя методика и несколько усложнялась благодаря введению момента прибавления сыворотки, мы все же имеем к-ру без

взвеси мельчайших частиц животной ткани. Однако, для получения массовых к-р такого рода среда вследствие необходимости применения большого количества сыворотки кролика оказывается малопригодной.

При дальнейших поисках возможности замены кроличьей сыворотки нами были поставлены опыты с заменой этой сыворотки прежде всего лошадиной, затем асцитической жидкостью и бараньей сывороткой. Из этих опытов выяснилась непригодность лошадиной сыворотки и асцитической жидкости (спирохэты встречались изредка). Что же касается бараньей сыворотки (нагретой 1 ч. при 60°), то она дала хорошие результаты, в особенности с бульоном Готтингера (1:2), pH = 7,6. В контрольных опытах с исключением кусочка ваты, но при добавлении сыворотки к бульону, под вазелином, получался рост спирохэт, но он наступал медленнее, отсутствовала закономерность в положительных результатах (иногда спирохэты не развивались) и никогда такие культуры не достигали того пышного развития, какое наблюдалось на среде из бульона Готтингера с кусочками ваты и добавлением 10% бараньей сыворотки. На „ватной" среде с бараньей сывороткой мы получали такие же результаты, как и на аналогичной же среде с добавлением кроличьей сыворотки. Преимущество первой среды очевидно, так как сыворотка барана для массовых культур является более доступной, чем сыворотка кролика.

В заключение мы остановились еще на опытах выращивания sp. pallida наших штаммов на обычно применяемой питательной среде с кусочками печени при доступе воздуха, т. е. без заливки вазелином, так как Hoder в своих опытах выращивания sp. pallida на жидких питательных средах указывает, что заливка жидким парафином играет второстепенную роль. Этот автор мог без ущерба для развития спирохэт получить ряд генераций к-р, выращиваемых при полном доступе воздуха. В аналогичных опытах (нашими штаммами и шт. Reiter'a) мы получили иные результаты: развитие спирохэт при доступе воздуха идет медленнее, не достигает того максимума развития, который характеризуется даже сильным помутнением всей питательной среды и образованием осадка из спирохэт, которые мы наблюдаем при выращивании под слоем вазелина, 2) спирохэты оказываются слабо и едва подвижными, а с энергичной подвижностью встречаются только на дне пробирки, в области кусочка печени и 3) нам удалось провести лишь 2 генерации, в 3-ей генерации развития спирохэт не наступило. Таким образом, на основании этих опытов, мы считаем, что для развития sp. pallida наших штаммов заливка вазелином, т. е. исключение доступа воздуха играет весьма важную роль; без заливки вазелином поддерживание к-р в ряде генераций невозможно [1]).

Выводы:

1) Применение „ватных" сред по методу Врублевского для выращивания sp. pallida наших штаммов не дало положительных результатов.

2) Замена кусочков животной ткани ватой оказалась возможной лишь при условии добавления к питательному бульону 10% сыворотки

[1]) Когда настоящая статья была уже закончена, нам стала известной интересная работа Hilgermann'a о культивировании sp. pallida на средах с кусочком желтого фосфора.

кролика или барана. В этом случае, в особенности же применяя Готтингеровский бульон (1 : 2), pH = 7,6, с добавлением 10% сыворотки барана, нагретой при 60° втечение 1 часа, возможно получение под вазелином культур, которые по пышности развития ничем не отличаются от к-р, получаемых на бульоне с кусочками печени.

3) Наши культуры sp. pallida без заливки вазелином, т. е. при доступе воздуха, не развиваются.

Из экспериментального отделения (завед. Л. Л. Бродский) 1-го Украинского гос. дермато-венерологического института имени Е. С. Главче (директор — М. Г. Хорошин).

Опыт выращивания бледной спирохэты в тканевых культурах.

М. М. Израэльсона.

Условия жизни микроорганизмов в тканевых культурах, конечно, не идентичны условиям их жизни в живом организме, но они приближаются к ним и потому очень многие вопросы, связанные с взаимоотношением между живой тканевой клеткой и вирусом, могут быть разрешены при непосредственном наблюдении in vitro.

Carrel и Jngebrigsten[1]) первые показали, что ткани, выращиваемые вне организма, способны вырабатывать антитела. В тканевых культурах можно получить выработку гемолизинов, бактериолизинов (Schilf[2]), преципитинов (Pzygode[3]), Bloom, Löwenthal и Micsch[4]) в культурах из селезенки кролика наблюдали фагоцитоз. Smyth[5]) выращивал в тканевых культурах различные виды микробов и сделал чрезвычайно интересное наблюдение: оказалось, что некоторые патогенные микроорганизмы как бы способствуют пролиферации фибробластов, загрязненные же вульгарными микробами культуры быстро погибают. Lewis[3]) отмечает, что в культурах желез, зараженных in vitro tbc, появляются полибласты и характерные для tbc продукты их преобразования: эпителиоидные и гигантские клетки. Эпителиоидные клетки фагоцитируют, туберкулезные палочки, окружая их колонии, соединяются в группы, сливаются в гигантские клетки, образуя гистологически типичный бугорок.

Особенно ценным оказался метод тканевых культур при выращивании фильтрующихся вирусов. Фильтрующиеся вирусы могут жить и размножаться in vitro только в симбиозе с тканевыми элементами; с прекращением жизни ткани прекращается жизнь и размножение фильтрующегося вируса.

Спирохэт выращивали в тканевых культурах очень мало. Steinhardt'y[6]) первому еще в 1913 г. удалось культивировать в тканевых культурах бледную спирохэту. Выращивал еще спирохэт (Sp. pallida и Sp. gallinorum) и Levaditi[7]). Levaditi отмечает, что спирохэты не способны развиваться в тканевых культурах: несмотря на пышный рост фибробластов, Sp. gallinorum живет в культуре фибробластов не дольше 5—6 дней. Бледная спирохэта в тканевых культурах, по Levaditi, также быстро теряет свою жизнеспособность и вирулент-