

Л. Д. ЖУРУЛИ

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ВАРИАНТОВ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

Из биологических свойств лекарственноустойчивых вариантов туберкулезных палочек особый интерес представляет вирулентность, так как с ней связан вопрос об эпидемиологической значимости возбудителя туберкулеза.

Снижение вирулентности туберкулезных микобактерий может произойти под влиянием ряда факторов. По наблюдениям ряда авторов, вирулентность меняется под влиянием защитных сил организма, при продолжительном культивировании на искусственных питательных средах, под воздействием химиотерапевтических препаратов [1, 2].

По данным большинства исследователей, стрептомициноустойчивые варианты туберкулезных палочек сохраняют свою вирулентность для морских свинок и вызывают у людей прогрессирующее туберкулезное заболевание.

По вопросу изменения вирулентности туберкулезных палочек резистентных к производным гидразидов изоникотиновой кислоты в литературе имеются весьма противоречивые данные. По наблюдениям некоторых авторов [3, 4,], фтивазидоустойчивые варианты возбудителя туберкулеза также вирулентны для морских свинок, как и чувствительные. Другие исследователи [6, 7, 8] указывают на снижение вирулентности БК, резистентных к изониазиду.

В доступной нам литературе мы не смогли найти указания на изменение биологических свойств туберкулезных палочек, устойчивых к ПАСК.

Отсутствие в литературе единого мнения об изменениях вирулентности лекарственноустойчивых форм возбудителя туберкулеза побудило нас провести в Институте тонкой органической химии АН АрмССР (директор Института академик АН АрмССР А. Л. Мнджоян) изучение вирулентности устойчивых вариантов микобактерий и заняться сравнительным исследованием различных методов определения вирулентности БК.

Наряду с классическим методом изучения вирулентности за последние годы предложен ряд косвенных методов. Мы в своей работе занялись сравнительным изучением наряду с биологическим доступных нам цитохимических методов определения вирулентности, значение которых почти не освещено в советской литературе.

Определение вирулентности цитохимическим методом по Дюбо и Миддлебуку [9] проводилось только со свежевыделенными культурами, так как при длительном пассировании на искусственных питательных средах

туберкулезные палочки теряют способность давать специфическую реакцию с нейтральным красным. При работе с культурами, адаптированными к стрептомицину *in vitro*, штаммы перед проверкой вирулентности проводились через организм морской свинки.

Небольшое количество свежевыделенной культуры туберкулезных палочек вносилось в центрифужную пробирку (на один штамм брались 2 пробирки) и для получения взвеси растиралось на стенке пробирки стерильной стеклянной палочкой. Взвесь дважды промывалась 50% раствором метилового алкоголя при 37°, в течение часа. Затем взвесь центрифугировалась в течение 10 мин. при 1500 об/м. Жидкость сливалась и осадок ресуспендировался в 5 мл боратного буфера — РН 8, 9. Последний в наших опытах с успехом заменял барбитуратный буфер, предложенный авторами методики. К полученной суспензии добавлялся 1 мл водного раствора нейтрального красного (10 мг%) и смесь тщательно встряхивалась. Добавление краски к щелочной среде (РН 8, 9) окрашивало последнюю в желтый цвет. Через 5 мин. начинался процесс связывания краски с клетками микобактерий, длившийся обычно не более 30 мин. Осадок культуры на дне пробирки принимал те или иные оттенки красного цвета в зависимости от вирулентности туберкулезных палочек. Так, культура вирулентных микобактерий окрашивалась в насыщенно-красный цвет, средневирulentных в светло-красный и слабо вирулентных в розовый или бледно-розовый. Авирulentные штаммы и культуры кислотоупорных сапрофитов не вступали в реакцию с краской и цвет осадка не менялся. Внесение в среду дополнительных количеств раствора нейтрального или выдерживание опыта в течение 12 ч. при комнатной температуре не меняло результатов реакции.

Проверка вирулентности каждой культуры цитохимической пробой по Дюбо проводилась дважды.

Для заражения морских свинок мы брали свежевыделенные культуры туберкулезных палочек трех-четырехнедельного возраста со среды Любенау или глицеринового картофеля. Определенное количество культуры БК платиновой петлей переносилось в пакетик из стерильной фильтровальной бумаги, высушивалось между его листками и взвешивалось на торсионных весах. Культура переносилась в стерильную фарфоровую ступку, пакетик снова взвешивался и по разнице весов вычислялся вес культуры в мг. Бактериальная масса растиралась в ступке при постепенном добавлении физиологического раствора, затем переносилась в колбу с стеклянными бусами, где тщательно встряхивалась в течение 5—10 мин. для получения однородной суспензии палочек.

Испытание вирулентности в основном производилось тремя дозами: 0,00001, 0,001 и 0,1 мг. Каждая доза вводилась под кожу двум морским свинкам в правую паховую область. Некоторые культуры вводились только в одной дозе 0,1 мг двум морским свинкам. В опыт брались морские свинки весом в 300—400 г с отрицательной реакцией на внутрикожное введение 0,1 мл 1/10 раствора АТК.

Животные выдерживались до естественной смерти от туберкулезной инфекции. В период наблюдения, каждые две недели проверялись вес морских свинок, изменения на месте введения культуры туберкулезных палочек и состояние регионарных лимфатических желез.

При вскрытии погибших животных отмечались туберкулезные и неспецифические изменения внутренних органов (легких, печени, селезенки), лимфатических желез (регионарных, подкожных, мезентериальных, парааортальных, парапортальных), а также изменение на месте введения инфекции.

Степень пораженности органов учитывалась по четырехбальной схеме Вейсфейлера [10]. О вирулентности исследуемой культуры мы судили по срокам выживаемости, учитывая также и степень пораженности органов.

Культура считалась вирулентной, если она вызывала смерть морских свинок в дозе 0,1 мг в течение 2—3 мес., в дозе 0,001 мг в течение 3—4 мес. и в дозе 0,00001 мг в течение 4—6 мес. Штаммы, вызывающие смерть свинок в течение 3—4, 4—5 и 6—8 мес., соответственно, мы считали средне вирулентными. Слабовирулентными считались культуры туберкулезных палочек, которые убивали свинок после указанных сроков.

Нами двумя методами определения вирулентности была изучена вирулентность 13 культур, устойчивых к стрептомицину, и 6 культур, устойчивых к фтивазиду. Кроме того, проверялась вирулентность 5 штаммов, выделенных у тех же больных до лечения фтивазидом.

Из 13 культур вирулентность 10 штаммов проверялась до и после адаптации их к стрептомицину *in vitro*. Из остальных трех культур — две (15 и 15а) были выделены у одного и того же больного, в процессе лечения стрептомицином и ПАСК, и были резистентны к 100 и 200 ед./мл антибиотика и 8 мг% натриевой соли парааминосалициловой кислоты. Один штамм (76) был выделен у больного после введения 150 г стрептомицина и 120 г фтивазида и оказался высокорезистентным к обоим препаратам (1000 мл стрептомицина и 8 г/мл фтивазида).

В табл. 1 и 2 приведены данные чувствительности к стрептомицину и фтивазиду и результаты изучения вирулентности культур туберкулезных микобактерий обоими методами.

Как видно из табл. 1, где для простоты приведена только часть штаммов, повышение устойчивости к стрептомицину не сопровождается заметным изменением вирулентности возбудителя туберкулеза.

Так, культура 15, устойчивая к 100 ед./мл, как видно из данных таблицы, оказалась сильно вирулентной как в опытах на животных, так и при определении цитохимической пробой. Какое-нибудь заметное изменение вирулентности после повышения устойчивости штамма до 200 ед./мл стрептомицина (штамм 15а) мы не смогли отметить.

Культура 76 оказалась средне вирулентной по обоим методам. Больной, у которого был выделен этот штамм, погиб от тяжелого фиброкавернозного туберкулеза. Этот случай показывает, что нет прямой зависимости между клиническим течением заболевания и вирулентностью туберкулезных палочек. Развитие высокой резистентности к стрептомицину и фтива-

Таблица 1

№ штамма	Устойчивость к стрептомицину в ед./мл.	Гибель животных после заражения (в днях)	Степень вирулентности для свинок	Степень вирулентности по цитохимической пробе
		доза заражения 0,1 мг		
15	100	68 77	сильная	сильная
15a	200	59 80	сильная	сильная
76	1000	109 99	средняя	средняя
6	15	235 240	очень слабая	очень слабая
6 (уст)	20000	240 252	очень слабая	очень слабая
bov (Vallee)	1	90 101	сильная	сильная
bov (Vallee) уст	20000	93 76	сильная	сильная
4	5	89 90	сильная	сильная
4a	2500	70 67	сильная	сильная
9	10	35 35	очень сильная	сильная
9a	100	67 79	сильная	сильная
27	200	69 72	сильная	средняя
27a	20000	62 58	сильная	средняя
34	2	90 84	сильная	сильная
34a	20000	12 (пневмония) 105	средняя	средняя
39	15	88 102	средняя	средняя
39a	2500	75 69	сильная	слабая

зиду, по-видимому, не оказало влияния на степень вирулентности возбудителя туберкулеза.

Штамм 27, выделенный у больного после 67 г стрептомицина, резистентный к 200 ед./мл антибиотика, оказался сильно вирулентным для свинок и средневирulentным при определении цитохимической пробой. В процессе воспитания устойчивости *in vitro* этот штамм начал расти при концентрации антибиотика в 20 000 ед./мл. Какого-нибудь заметного изменения вирулентности после резкого повышения резистентности, как видно из данных таблицы, не было отмечено.

Лабораторные штаммы К₆ и *bovinus* (Vallee), первоначально устойчивые к 15 и 1 ед./мл стрептомицина, соответственно, в процессе адаптации *in vitro* стали резистентными к 20 000 ед./мл антибиотика. Культура К-6 оказалась очень слабо вирулентной по обоим методам. Морские свин-

ки, зараженные 0,1 мг туберкулезных палочек, погибли через 240 дней с незначительными туберкулезными изменениями во внутренних органах. Реакция с нейтральным красным показала очень слабо-розовое окрашивание осадка. Повышение устойчивости не изменило вирулентность туберкулезных микобактерий. Штамм *bovinus* (Vallée) также сохранил сильную вирулентность для морских свинок после повышения резистентности в 20 000 раз.

Менее резкое повышение устойчивости до 100 ед./мл. (штамм 9) также не сопровождалось изменением вирулентности.

Таким образом разбор данных определения вирулентности туберкулезных палочек, чувствительных и устойчивых к стрептомицину, показывает, что повышение резистентности БК к антибиотику как в организме больного, так и в процессе привыкания *in vitro* не сопровождается изменением вирулентности.

Таблица 2

№ штамма	Чувствительность к фтивазиду в γ/мл	Гибель животных после заражения (в днях)	Степень вирулентности для свинок	Степень вирулентности по цитохимической пробе
		доза заражения 0,1 мг		
99	0.06	89 101	средняя	сильная
99a	5	95 105	средняя	средняя
100	0.25	75 63	сильная	сильная
100a	4	94 103	средняя	сильная
101	0.06	45 53	сильная	сильная
101a	20	125 122	средняя	сильная
102	0.25	96 112	средняя	средняя
102a	2	100 96	средняя	средняя
103	0.25	115 120	средняя	средняя
103a	1	108 112	средняя	средняя
79	10	120 135	средняя	средняя

Данные, приведенные в табл. 2, указывают, что заметного снижения вирулентности туберкулезных микобактерий в связи с понижением их чувствительности к фтивазиду не происходит. Культуры, выделенные у больных до терапии, оказались сильно вирулентными для морских свинок в трех и средне вирулентными в двух случаях. В случаях 99, 102 и 103 штаммы, выделенные у больных в процессе лечения фтивазидом и умеренно чувствительные (штамм 103a), или умеренно устойчивые (штамм

99а, 102а) к этому препарату, не изменили свою вирулентность для морских свинок. Проба с нейтральным красным в опыте со штаммом 99 показала некоторое изменение степени вирулентности с сильной на среднюю.

Морские свинки, зараженные штаммом 100а, погибли от генерализованного туберкулеза на 28—29 дней позже, чем животные, инфицированные чувствительным вариантом туберкулезных микобактерий (штамм 100). Проба с нейтральным красным не показала изменения вирулентности культуры. В случае 101, при понижении чувствительности возбудителя туберкулеза до 20 γ /мл (штамм 101а), гибель морских свинок, зараженных устойчивым вариантом, наступила на 74 дня позже смерти животных, зараженных штаммом, чувствительным к 0,06 γ /мл фтивазида (штамм 101). В опытах с нейтральным красным как чувствительный, так и устойчивый варианты оказались сильно вирулентными. Культура 79, устойчивая к 8 γ /мл фтивазида, оказалась средне вирулентной по обоим методам изучения вирулентности.

Таким образом, в процессе повышения устойчивости туберкулезных палочек к фтивазиду мы в двух случаях наблюдали более медленное развитие генерализованной туберкулезной инфекции у экспериментальных животных, на основании наших небольших данных мы предполагаем, что в этих случаях, по-видимому, имеется не снижение вирулентности культур, а уменьшение скорости роста резистентности к фтивазиду туберкулезных микобактерий. Различия в степени пораженности органов в опытах с чувствительными и резистентными штаммами нам не удалось отметить. Более медленный рост фтивазидоустойчивых вариантов возбудителя туберкулеза мы наблюдали также при изучении скорости роста туберкулезных микобактерий. В литературе имеются указания на уменьшение скорости роста туберкулезных палочек, резистентных к фтивазиду [11, 12].

Сравнительное изучение обоих методов определения вирулентности использованием достаточного материала лекарственночувствительных и устойчивых вариантов микобактерий показало, что данные обоих методов, в основном, совпадают. В опытах со стрептомициноустойчивыми культурами только в одном случае (штамм 39) было замечено расхождение между данными обоих методов. Эта культура до адаптации к стрептомицину *in vitro* оказалась высоко вирулентной по обоим методам. После повышения устойчивости до 2500 ед./мл цитохимическая проба показала понижение вирулентности, тогда как морские свинки погибли в течение 69—75 дней от дозы 0,1 мг. По-видимому, в данном случае штамм отчасти утратил свою способность фиксировать краску после продолжительных пересевов на питательные среды. Однократный пассаж через организм морской свинки не способствовал повышению этой способности (табл. 1).

В опытах же с фтивазидоустойчивыми культурами такое расхождение было получено в двух случаях (штаммы 100а и 101а). Эти штаммы вызвали у морских свинок затяжной туберкулезный процесс, тогда как проба с нейтральным красным выявила сильную вирулентность культур (табл. 2).

Такое расхождение в степени вирулентности культур по двум методам следует, по-видимому, объяснить, как говорилось выше, более медленным ростом устойчивых вариантов в организме морской свинки, что не могло быть выявлено цитохимической пробой.

Для подтверждения своих данных определения вирулентности цитохимической пробой по Дюбо мы проверили также вирулентность кислотоупорного сапрофита В₅. Опыты показали, что штамм В₅ совершенно не вступает в реакцию с нейтральным красным. Осадок культуры на дне пробирки после прибавления раствора краски сохраняет свой светло-желтоватый цвет.

Таким образом, наши данные по сравнительному изучению двух методов определения вирулентности: биологического метода и цитохимической пробы с нейтральным красным по Дюбо показали, что цитохимический метод дает довольно точные данные, совпадающие с результатами, полученными биологическим методом. Применение этого метода в лабораторной практике облегчается быстротой и простотой методики. Метод этот может быть применен, вместе с биологическим, для получения более точных данных о вирулентности изучаемых культур. Цитохимическая проба может быть применена также и отдельно для получения ориентировочных данных по вирулентности возбудителя туберкулеза в условиях, где отсутствуют возможности заражения животных. Введение в лабораторную практику такой легкой и доступной методики определения вирулентности диктуется, по нашему мнению, все возрастающей необходимостью повседневного определения вирулентности туберкулезных палочек, так как противотуберкулезные средства как сами по себе, так и способствуя образованию лекарственно-устойчивых форм микобактерий, могут вызвать изменение их вирулентности.

Опыты по изучению вирулентности двумя методами показали, что лекарственно-устойчивые формы возбудителя туберкулеза остаются вирулентными. Не отмечается также различий в вирулентности вариантов микобактерий, адаптированных к стрептомицину *in vitro* и *in vivo*. Сохранение вирулентности микобактериями, устойчивыми к химиопрепаратам, еще раз подчеркивает большую опасность образования лекарственно-устойчивых форм возбудителя туберкулеза и необходимость применения методов, предотвращающих развитие резистентности.

В ы в о д ы

1. Изучена вирулентность культур туберкулезных микобактерий, устойчивых к стрептомицину, ПАСК и фтивазиду. Наряду с классическим методом заражения животных применялись новые методы цитохимического определения вирулентности. Наилучшим методом изучения вирулентности пока остается биологический.

2. Цитохимическая проба на вирулентность с нейтральным красным дает достаточно точные и совпадающие с биологическим методом показатели вирулентности возбудителя туберкулеза. Этот метод, ввиду своей

несложности и доступности, может быть широко внедрен в лабораторную практику туберкулеза для получения ориентировочных данных о вирулентности туберкулезных палочек.

3. Оба метода не выявили изменения в степени вирулентности микобактерий, устойчивых к стрептомицину, ПАСК или фтивазиду.

4. Туберкулезные палочки, устойчивые одновременно к стрептомицину и ПАСК или стрептомицину и фтивазиду, сохраняют свою вирулентность для морских свинок.

5. Не имеется различий в вирулентности возбудителя, туберкулеза, адаптированного к действию стрептомицина *in vivo* в организме больного в процессе лечения, и *in vitro* — при пересевах на среды, с возрастающими концентрациями антибиотика.

6. При заражении животных фтивазидоустойчивыми культурами микобактерий в некоторых случаях наблюдается более медленное развитие экспериментальной туберкулезной инфекции, что, по-видимому, обусловлено уменьшением скорости роста резистентных к фтивазиду вариантов микобактерий.

Институт тонкой органической химии
АН АрмССР

Поступило 27.III 1959 г.

Լ. Դ. ԺՈՒՐՈՒԼԻ

ՏՈՒՔԵՐԿՈՒԼՅՈՋԻ ՀԱՐՈՒՑԻՉԻ ՔԻՄԻՈՒԵԶԻՍՏԵՆՏ ՎԱՐԻԱՆՏՆԵՐԻ ԲԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Տուրերկուլյոզային միկրոբի քիմիոուելիստենտ վարիանտների բիոլոգիական հատկություններից առանձնապես մեծ հետաքրքրություն է ներկայացնում վիրուլենտությունը, քանի որ վերջինիս հետ է կապված տուրերկուլյոզի հարուցիչի էպիդեմիոլոգիական դերը:

Մեր աշխատանքների ընթացքում հետազոտություն է նեթարկվել ըստ-րեպատմիցինի, ֆտիվադիդի կամ պարաամինոսալիցիլաթթվի հանդեպ կալուն տուրերկուլյոզային շտամների վիրուլենտությունը և միաժամանակ ուսումնասիրվել են վիրուլենտության որոշման բիոլոգիական ու ցիտոքիմիական մեթոդները:

Ստացված համեմատական տվյալների համաձայն ստրեպտոմիցինի, ֆտիվադիդի, պարաամինոսալիցիլաթթվի հանդեպ տուրերկուլյոզի հարուցիչի քիմիոկալունության աճը չի ուղեկցվում վիրուլենտության անկումով:

Իրենց վիրուլենտությունը լաբորատոր կենդանիների նկատմամբ չեն կորցրել նույնիսկ այն շտամները, որոնց ստրեպտոմիցինոկալունությունը *in vitro* կատարվող պարբերաբար ցանքերի հետևանքով հասցվել էր մինչև 20000 միավորի:

Ֆտիվադիդի հանդեպ կալուն որոշ կուլտուրաներ մեր փորձերում ծովախոզուկների մոտ առաջացրին դանդաղ ընթացող էքսպերիմենտալ տուրերկուլյոզային պրոցես: Ինֆեկցիայի այդ դանդաղ ընթացքը, հավանորեն կապված է միկրոբների աճի անկման հետ:

Վիրուլենտութիւն որոշման ուսումնասիրված մեթոդներից բիոլոգիական մեթոդը լավագույնն է:

Յիտոքիմիական մեթոդներից նեյտրալ կարմիրի մեթոդը տալիս է վիրուլենտութիւն իրականին ճիշտ և բիոլոգիական մեթոդի ցուցմունքների հետ համընկնող տվյալներ: Այդ մեթոդը, շնորհիվ իր պարզութիւն և մատչելիութիւն, կարող է լայն կիրառութիւն գտնել տուբերկուլոզի լաբորատոր պրակտիկայում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Вичканова С. А. ЖМЭИ 4, 1949.
2. Вейсфейлер Ю. К. Проблемы туберкулеза, 6, 1949.
3. Дабкина Р. О. Тез. док. научной сессии Института туберкулеза АМН СССР. М., 48—49.
4. Кузнецова К. В. Тез. докл. научной сессии Свердловского областного научно-исследовательского туберкулезного института. 1953.
5. Макеева О. О. и Першин Г. Н. Докл. на объединенном заседании химиотерапевтической и туберкулезной секции Московского отделения общества микробиологов, эпидемиологов и инфекционистов им. Мечникова. 21/1 1954.
6. Middlebrook G., Cohn M. L. Science 118, 3063, 1953.
7. Peizer L. R., Widelock Di, Klein S. Am. Rev. Tuberc 68, 1953.
8. Mitchison D. A. Am. Rev. Tuberc. 69, 4, 1954.
9. Dubos R. J. & Middlebrook G. Am. Rev. Tuberc. 58, 6, 1948.
10. Вейсфейлер Ю. К. и Лещинская Е. Н. Проблемы туберкулеза. 5, 1942.
11. Fischer M. W. Am. Rev. Tuberc. 66, 5, 1952.
12. Szybalsky W. & Bryson W. Am. Rev. Tuberc. 65, 6, 1952.