

Л. Д. ЖУРУЛН

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ВАРИАНТОВ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

Образование устойчивых вариантов микроорганизмов происходит в результате взаимодействия микробной клетки с антибактериальным веществом, как адекватная реакция на вредные факторы внешней среды.

В процессе повышения устойчивости в метаболизме бактериальной клетки происходят глубокие и необратимые изменения, которые передаются по наследству, и в результате образуются новые разновидности микробов. Процесс образования резистентных форм бактерий сопровождается нередко изменением ряда признаков микробной клетки, в том числе морфологических, культуральных и биологических свойств.

Согласно данным большинства исследователей, образование лекарственно-устойчивых форм туберкулезных микобактерий не сопровождается заметными микро- и макроскопическими изменениями морфологии микробной клетки [1, 2, 3]. Однако некоторые исследователи [1] указывают на образование влажных, жирных колоний в культуре туберкулезных палочек, устойчивых к стрептомицину.

Особенно мало изучены морфологические свойства микобактерий, устойчивых к фтивазиду, сравнительно новому, в настоящее время широко применяемому противотуберкулезному препарату. В доступной нам литературе мы не смогли также найти указания о морфологических изменениях вариантов возбудителя туберкулеза, устойчивых к ПАСК.

Изучение морфологических и биохимических особенностей туберкулезных микобактерий может раскрыть многое в механизме образования лекарственно-устойчивых форм и потому изучение этого вопроса имеет большое теоретическое и практическое значение. Раскрытие механизма образования устойчивых форм может предсказать пути предотвращения развития резистентности туберкулезных палочек к широко применяемым противотуберкулезным препаратам.

С этой точки зрения определенный интерес представляло изучение морфологии вариантов туберкулезных микобактерий, устойчивых к стрептомицину, ПАСК и фтивазиду, выделенных у больных, леченных этими препаратами, а также штаммов, адаптированных к химиопрепаратам.

Поэтому нами в Институте тонкой органической химии АН АрмССР были проведены исследования морфологических свойств туберкулезных микобактерий и были подвергнуты сравнительному изучению доступные нам методы исследования этих свойств.

Приступая к изучению морфологических и биохимических свойств резистентных туберкулезных микобактерий, мы полагали, что эти изменения могут быть более резко выражены у высокоустойчивых вариантов. С целью получения высокоустойчивых культур БК мы занялись воспитанием устойчивости туберкулезных палочек к стрептомицину *in vitro*.

В опыты по воспитанию резистентности *in vitro* были включены 22 культуры с различной исходной чувствительностью. Это проводилось с целью выявления зависимости между скоростью образования стрептомициноустойчивых вариантов БК и их исходной чувствительностью, так как по имеющимся в литературе данным такая зависимость не была обнаружена в опытах с другими культурами.

Опыты по воспитанию устойчивости велись на яично-агаровой среде Герольда, содержащей возрастающие концентрации антибиотика. Наши опыты показали, что при адаптации туберкулезных палочек к химиопрепаратам среда Герольда может с успехом заменить сложные яичные среды Петрацьани, АТS и др. При пассировании на этой среде туберкулезные микобактерии легко приспосабливаются к концентрациям стрептомицина, губительными для них в начале опыта.

Анализ данных показывает, что степень нарастания устойчивости, в основном, не зависит от исходной чувствительности микобактерий к стрептомицину. Некоторая зависимость в этом отношении отмечается только у высокоустойчивых к стрептомицину культур возбудителя туберкулеза.

Особенно резкое повышение устойчивости (до 10 000—20 000 ед/мл) дали лабораторные штаммы *Myc. tuberculosis* K<sub>6</sub> u bov (Vallée) и культуры с резко выраженными изменениями процессов ассимиляции, в результате длительного пребывания вне организма, являющегося для них естественной средой. Высокорезистентные варианты были получены также при пассировании штаммов, выделенных у больных, лечившихся стрептомицином. По нашему мнению, у этих культур резкий сдвиг в обмене веществ, присущий устойчивым к стрептомицину вариантам, произошел еще в организме больного.

Сравнительное изучение процесса развития устойчивости к стрептомицину *in vitro* и *in vivo* показало, что в большинстве случаев культивирование на средах с возрастающими концентрациями антибиотика ведет к более резкому и значительному повышению резистентности, чем это имеет место в организме при лечении больных стрептомицином.

Это обусловлено различными условиями взаимодействия препарата и микроба при эксперименте в пробирке с одной стороны и в организме больного — с другой. Решающее значение в развитии устойчивости, конечно, имеет сам макроорганизм, форма и тяжесть туберкулезного процесса.

Получив, таким образом, высокоустойчивые штаммы туберкулезных микобактерий, мы начали изучение морфологических особенностей химиорезистентных вариантов возбудителя туберкулеза.

С целью выявления изменений в морфологии лекарственно-устой-

чивых вариантов туберкулезных микобактерий нами было проведено макро- и микроскопическое изучение морфологии 45 штаммов БК, резистентных к стрептомицину, ПАСК или фтивазиду, и их сравнение с исходными чувствительными формами.

Из 45 культур туберкулезных палочек 32 штамма были резистентны к стрептомицину, причем 22 адаптировались к антибиотику *in vitro*, а 10 были выделены у больных на разных сроках лечения стрептомицином, 9 культур были выделены у больных легочным туберкулезом в процессе лечения фтивазидом и 2 культуры — у больных, лечившихся натриевой солью парааминосалициловой кислоты. 2 штамма, выделенные у больных, лечившихся вначале стрептомицином, затем фтивазидом, были устойчивы к обоим препаратам.

Макроскопическое исследование морфологии лекарственно-устойчивых культур туберкулезных палочек проводилось на яичной среде Герольда и ограничивалось только изучением внешнего вида, величины, формы, пигментации и сухости колонии.

Определение морфологии по Дюбо [5] не представлялось возможным, ввиду отсутствия у нас поверхностно-активного вещества — Туин-80, необходимого для получения диффузного роста туберкулезных микобактерий.

Макроскопическое изучение морфологии возбудителя туберкулеза не выявило каких-либо заметных различий между устойчивыми к стрептомицину, ПАСК и фтивазиду туберкулезными микобактериями и их исходными чувствительными вариантами.

Все 45 культур БК давали типичный рост сухих, морщинистых, шероховатых, не пигментированных, слегка желтоватых колоний на среде Герольда.

Морфология штаммов 76 и 79, устойчивых как к стрептомицину, так и фтивазиду, также не отличалась ничем от морфологии чувствительных культур.

Не были отмечены различия в морфологии колоний культур туберкулезных микобактерий, развивших устойчивость к стрептомицину *in vivo* в организме больных и *in vitro* при пассировании культур на средах с возрастающими концентрациями антибиотика.

Для всестороннего микроскопического изучения морфологии туберкулезных палочек мазки из культур чувствительных и устойчивых микобактерий исследовались обычной окраской по Циль-Нильсену, флюоресцентной и фазовой микроскопией.

Включение этих 3 методик в исследование имело цель дать оценку различным методам изучения морфологии туберкулезных палочек, применяющихся в современной микробиологии. Такое сравнительное изучение дало бы также возможность правильного выбора соответствующих методов исследования морфологии микобактерий.

Кроме того, использование новейших методов исследования — флюоресцентной и фазовой микроскопии облегчило бы, как мы предпо-

лагали, выявление различий в морфологии устойчивых вариантов возбудителя туберкулеза.

В настоящее время в диагностике туберкулеза все шире и шире используется метод флюоресцентной микроскопии. Туберкулезные палочки, окрашенные флюорохромами, хорошо выявляются в мокроте, гное и, в особенности, в промывных водах желудка и в «паутинке» спинномозговой жидкости при туберкулезном менингите, где они другими методами обнаруживаются с большим трудом.

Н. Н. Бобровым [6] разработана доступная техника флюоресцентной микроскопии для лабораторной диагностики туберкулеза.

Препараты, изучаемые во флюоресцентном микроскопе, окрашиваются специальными красками — флюорохромами. Для окрашивания туберкулезных палочек широко применяются краски аурамин-родамин, аурамин и акридин — желтый [7, 8].

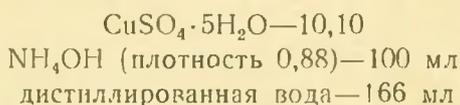
Мазки из культур возбудителя туберкулеза делаются тонкими, чтобы иметь возможность изучить морфологию отдельных клеток. При работе с толстыми мазками в микроскоп видны только ярко светящиеся скопления БК, в которых невозможно выделить отдельные палочки. Для препаратов мы брали тонкие и безукоризненно чистые предметные стекла.

Из каждой культуры туберкулезных палочек готовились по 3 мазка: I красился аурамин, II — аурамин-родамин и III — фуксином Циля.

Исследование мазков, окрашенных флюорохромами, мы вели обычным биологическим микроскопом системы М—Д.

Источником света в наших опытах служила точечная лампа накаливания 12w 100v от микрофотокамеры системы Цейс «Стандарт».

Важным звеном при работе с флюоресцентным микроскопом является правильный подбор светофильтров. В качестве желтого фильтра мы пользовались фильтрами от микроскопа «Люмпан» А. Так как подбор стеклянных синих фильтров трудный (они все пропускают красные лучи), то нами применялся жидкий светофильтр, изготовляемый следующим образом:



Если концентрация раствора подобрана правильно, то при рассмотрении препарата в микроскоп фон должен быть оливково-зеленого цвета.

Раствор сернокислой меди можно налить в любую четырехугольную аптекарскую склянку или кювету. Мы пользовались самодельной кюветой, рекомендованной В. А. Замковым [9].

Исследования мы вели при дневном свете, установив перед микроскопом небольшую ширмочку.

Так как флюоресцирующие желтые туберкулезные микобактерии

хорошо выделяются на темном поле, то увеличение в 200—300 раз было достаточно для их обнаружения. Для более тонкого изучения морфологии мы пользовались иммерсионным объективом, снабженным диафрагмой, регулируя которую можно было усиливать или ослаблять интенсивность светящегося объекта и более четко видеть детали.

Вместо иммерсионного масла, которое имеет собственную флюоресценцию, мы пользовались химически чистым глицерином.

При окраске аураминем туберкулезные палочки флюоресцировали желтыми, а аурамин-родамином — оранжево-красными лучами.

В наших опытах аурамино-родаминовый метод окраски оказался лучше аураминового, так как флюоресцирующие красным туберкулезные палочки на оливково-зеленом фоне препарата выделялись особенно четко.

Для изучения морфологии туберкулезных палочек мы пользовались также методом фазового контраста. Фазовоконтрастное приспособление дает возможность исследовать микробы в живом состоянии, не подвергая их воздействию различных красок, которые нередко нарушают нормальную структуру бактериальной клетки. Кроме того, пользуясь фазовоконтрастным приспособлением, возможно выявить в морфологии микробной клетки тонкие незаметные в обычный микроскоп изменения. Так, Уилл и другие [2], пользуясь контрастфазой, обнаружили тонкие морфологические различия в клетках вирулентных, авирулентных и непатогенных микобактерий.

Изучение морфологии лекарственноустойчивых форм туберкулезных микобактерий всеми тремя методами и сравнение с морфологией исходных чувствительных штаммов не выявило каких-либо отклонений в строении палочек.

В мазках устойчивых культур, окрашенных по Циль-Нильсену, были обнаружены типичные кислотоупорные туберкулезные палочки. Форма, величина, зернистость и окрашиваемость туберкулезных палочек, устойчивых к стрептомицину, ПАСК или фтивазиду, не отличались от морфологии чувствительных микобактерий.

При изучении морфологии микобактерий во флюоресцентный микроскоп мы обращали особое внимание на степень флюоресценции палочек. Как устойчивые, так и чувствительные туберкулезные палочки флюоресцировали одинаково ярким оранжево-красным светом на оливково-зеленом фоне препарата при окраске аурамино-родаминовым методом.

В мазках, окрашенных флюорохромами, более четко выделялся полиморфизм палочек. Лучше чем по Циллю были видны светящиеся мелкие обломки микобактерий, часто встречающиеся в старых культурах.

Структура отдельных палочек во флюоресцентный микроскоп при работе сухой системой была видна несколько хуже, чем в мазках, окрашенных по Циллю. При использовании иммерсионных объективов лучше выделялись зернистость и форма микобактерий.

Флюоресцентная микроскопия не дает преимуществ в изучении морфологии туберкулезных палочек, но может быть с успехом применена в лабораторной диагностике туберкулеза. По указанию Н. Н. Боброва [10], окраска флюорохромами до 15% увеличивает число положительных находок туберкулезных микобактерий.

В мазках культур туберкулезных микобактерий как чувствительных, так и устойчивых к стрептомицину, ПАСК или фтивазиду при изучении во флюоресцентном микроскопе были видны ярко светящиеся, слегка изогнутые, иногда зернистые палочки. Величина в отдельных культурах колебалась в небольших пределах (рис. 1 и 2).

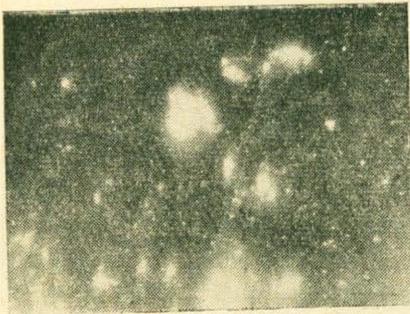


Рис. 1. Культура туберкулезных микобактерий, чувствительных к стрептомицину (штамм *bov. Vallée*, чувствительный к 2 ед/мл), при изучении флюоресцентным микроскопом. Окраска аурамин-родамином. Увеличение 200 $\times$ .

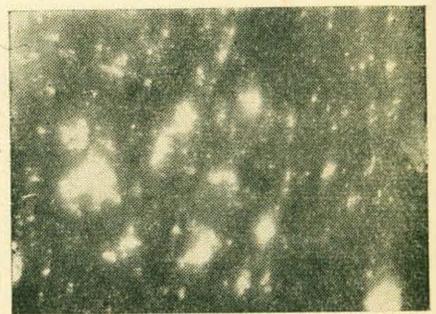


Рис. 2. Культура туберкулезных микобактерий, устойчивых к стрептомицину (штамм *bov. Vallée*, чувствительный к 50000 ед/мл), при изучении флюоресцентным микроскопом. Окраска аурамин-родамином. Увеличение 200 $\times$ .

Посредством фазового контраста изучались неокрашенные фиксированные и нефиксированные препараты культур туберкулезных палочек. При большом увеличении (объектив 40 и окуляр 10) морфология отдельных палочек выявлялась особенно четко. На светлом фоне мазка хорошо выделялись темные, казавшиеся черными, нередко зернистые туберкулезные палочки. Через фазовый микроскоп была хорошо заметна оболочка бактериальной клетки.

Изучение туберкулезных палочек посредством фазового контраста не обнаружило различий в морфологии чувствительных и устойчивых штаммов (рис. 3 и 4).

Мы предполагали, что высокоустойчивые штаммы БК, полученные при воспитании резистентности *in vitro*, могут дать большие отклонения от морфологии типичных туберкулезных микобактерий. Однако в мазках от всех 22 культур возбудителя туберкулеза были обнаружены типичные, кислотоупорные, зернистые, слегка изогнутые палочки.

В трех случаях (штаммы 1, 18, 20) были обнаружены мелкие, довольно толстые, незернистые палочки в исходной чувствительной и длинные, тонкие, изящно-изогнутые зернистые палочки в устойчивой культуре БК.

Это небольшое различие в величине и форме палочек можно было бы принять за небольшие изменения в морфологии устойчивых микобактерий, если бы не обратная картина, полученная нами при изменении мазков штаммов 27 и 39. Туберкулезные палочки в этих двух культурах до адаптации к стрептомицину были тонкими, длинными, зернистыми, после же привыкания — толстыми, короткими и незернистыми.

Изучение культур туберкулезных микобактерий, устойчивых одновременно к стрептомицину и ПАСК (штамм 15) или к стрептомицину и фтивазиду (штамм 76 и 79), также не выявило никаких отклонений в морфологии палочек.

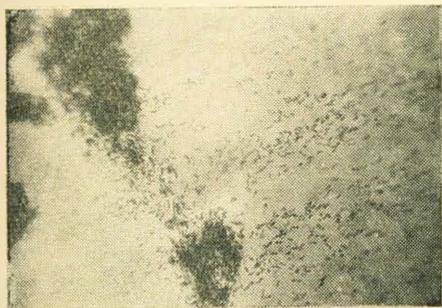


Рис. 3. Культура туберкулезных микобактерий, чувствительных к стрептомицину (штамм *Bov. Vallée*, чувствительный к 2 ед/мл), при изучении фазовым контрастом. Мазок не окрашен. Увеличение 400  $\times$ .



Рис. 4. Культура туберкулезных микобактерий, устойчивых к стрептомицину (штамм *Bov. Vallée* чувствительный к 50000 ед/мл), при изучении фазовым контрастом. Мазок не окрашен. Увеличение 400  $\times$ .

Для подтверждения полученных нами результатов мы изучили также морфологию 10 культур туберкулезных палочек, устойчивых к фтивазиду, и 20 культур, устойчивых к стрептомицину и фтивазиду, полученных нами из Всесоюзного химико-фармацевтического института и Московского научно-исследовательского туберкулезного института. Изучение этих штаммов не обнаружило изменений в морфологии резистентных вариантов.

Таким образом, наши исследования показали, что из примененных нами трех методов изучения морфологии, метод фазового контраста имеет ряд преимуществ перед двумя другими методами. Метод этот создает возможность изучения морфологии туберкулезных микобактерий в живом состоянии без повреждения бактериальной клетки различными красками. Морфология палочек, зернистость, оболочка при этом методе видны значительно лучше. Изучение морфологии микобактерий окраской по Циль-Нильсену несколько уступает фазовой микроскопии. Флуоресцентная микроскопия, по нашему опыту, не дает особых преимуществ при изучении морфологии туберкулезных палочек.

Применявшиеся нами методы изучения морфологии не обнаружили заметных макро- и микроскопических изменений у резистентных ва-

риантов туберкулезных палочек. Единственным исключением является метод окраски по Бенда-Урквия, который дает возможность установить морфологические и тинкториальные отличия между чувствительными и устойчивыми к стрептомицину формами возбудителя туберкулеза.

Полученные нами отрицательные результаты не позволяют сделать категорического заключения, что развитие резистентности не сопровождается морфологическими изменениями бактериальной клетки. Правильнее предположить, что изменения происходят, но не улавливаются сравнительно грубыми методами нашего исследования. Отрывочные сведения, полученные при изучении действия различных химиопрепаратов на туберкулезную палочку электронным микроскопом [11], указывают, что, по-видимому, только применение такого тонкого и сложного метода исследования может выявить морфологические отличия вариантов.

### В ы в о д ы

1. Изучены три метода исследования морфологии туберкулезных палочек — метод окраски по Циль-Нильсену, методы фазовой и флюоресцентной микроскопии.

2. Метод фазового контраста может быть широко использован при изучении морфологии возбудителя туберкулеза, так как этим методом возможно исследование микробов в живом состоянии и более тонкое изучение их структуры.

3. Метод флюоресцентной микроскопии не выявляет детали в строении туберкулезных микобактерий.

4. Образование лекарственно-устойчивых форм туберкулезных палочек не сопровождается заметными макро- и микроскопическими морфологическими изменениями, которые могут быть выявлены применявшимися нами методами микроскопии и окраски (обычный, фазоконтрастный и флюоресцентный микроскоп и окраска по Циль-Нильсену). Весьма вероятно, что такие изменения могут быть уловлены электронным микроскопом.

5. На среде Герольда, содержащей возрастающие концентрации стрептомицина, образование устойчивых к антибиотику форм туберкулезных палочек происходит легко и быстро. Эта среда может заменить сложные яичные среды Петраньяни, ATS и др. при адаптации микобактерий к стрептомицину, *in vitro*.

6. Из 22 культур туберкулезных микобактерий 21 штамм при культивировании на среде Герольда с возрастающими концентрациями стрептомицина дали нарастание устойчивости к антибиотику.

7. Скорость и степень развития устойчивости к стрептомицину не зависят от исходной чувствительности у штаммов чувствительных и слабоустойчивых (1—15 ед./мл).

8. У высокоустойчивых штаммов туберкулезных микобактерий первоначальная устойчивость оказывает определенное влияние на скорость и степень повышения устойчивости.

9. Развитие устойчивости туберкулезной палочки к стрептомицину *in vitro* и *in vivo* не всегда идет параллельно. Это расхождение можно объяснить различными условиями взаимодействия препарата и микроба в эксперименте и в больном организме.

Институт тонкой органической химии Академии наук АрмССР

Поступило 27.III 1959 г.

Լ. Գ. ԺԱԵՐՈՒԿ

ՏՈՒԲԵՐԿՈՒԼԵԶՈՂԻ ՀԱՐՈՒՑԻՉԻ ՌԵԶԻՍՏԵՆՏ ՎԱՐԻԱՆՏՆԵՐԻ ՄՈՐՖՈԼՈԳԻԱՅԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՄԱՆ ՄԵԹՈԳՆԵՐԻ ՀԱՄԵՄԱՏԱԿԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՇՈՒՐՋԸ

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Տուբերկուլյոզային միկրոօրակառուցվածքի քիմիոկայուն վարիանտների մորֆոլոգիան ղեկու բավարար չափով չի ուսումնասիրված: Այդ հարցի շուրջ մեզ մատչելի գրականության մեջ եղած ավյալները բավականին հակասական են:

Մենք հետազոտության ենք ենթարկել տուբերկուլյոզի հարուցիչի մորֆոլոգիայի ուսումնասիրման մի շարք մեթոդներ:

Ուսումնասիրված մեթոդներից ֆազային կոնտրաստի մեթոդը կարող է լայն կիրառություն գտնել տուբերկուլյոզի հարուցիչի մորֆոլոգիայի ուսումնասիրման ժամանակ: Այդ մեթոդով հնարավոր է հետազոտել միկրոդերմին կենդանի վիճակում և կատարել նրանց կառուցվածքի ավելի նուրբ ուսումնասիրություններ:

Ֆլյուորեսցենտ միկրոսկոպով հնարավոր չէ հայտնաբերել տուբերկուլյոզի հարուցիչի մորֆոլոգիայի մանրամասնությունները: Այդ մեթոդը մեծ առավելություններ ունի տուբերկուլյոզի լաբորատոր դիագնոստիկայի ժամանակ:

Ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ տուբերկուլյոզի հարուցիչի քիմիոկայուն վարիանտների առաջացումը չի ուղեկցվում ուսումնասիրության ավարտական մեթոդներով հայտնաբերվող մակրո- և միկրոսկոպիկ փոփոխություններով:

Հավանական է, որ այդպիսի փոփոխություններ տեղի են ունենում, բայց այն հնարավոր է հայտնաբերել էլեկտրոնային միկրոսկոպով:

Մորֆոլոգիական փոփոխություններ չեն հայտնաբերվել նաև տուբերկուլյոզի միկրոդերմինային շտամների մոտ, որոնց կայունությունը ստրեպտոմիցինի նկատմամբ *in vitro* Հերոլդի միջավայրի վրա պարբերաբար կատարվող ցանկերի ընթացքում հասցվել է բավականին բարձր աստիճանի (մինչև 20000 միավորի (սմ<sup>3</sup>):

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Esperson E. Acta Pathol. Microbiol. Scand, 28, 2, 174—193, 1951.  
2. Will D. W., Bishop F., Bogen E., Djang A., & Carpenter C. M. Diseases of the Chest, 19, 4, 387—410, 1951.  
3. Steenken M. J. & Wolinsky E. Am. Rev. Tuberc. 68, 4, 548—556, 1953.  
4. Courmont P. Bull. Union Intern. Contre Tuberc. XXI, 2, 148. 1951.

5. Middlebrook G., Dubos R. J. & Pierc C. J. *Exptl. Med.* **86**, 2, 175, 1947.
6. Бобров Н. Н. Бюллетень Института туберкулеза АМН СССР, 4, 40, 1948.
7. Мейсель М. Н. *Микробиология* XVI, 6, 527—544, 1947.
8. Wilson M. *Am. Rev. Tuberc.* 65, 6, 709—718, 1952.
9. Замков В. А. *Микробиология* XVII, 5, 400—401, 1948.
10. Бобров Н. Н. *Проблемы туберкулеза* 1, 58, 1949.
11. Bringmann G. *Zentr. Bakteriол. Parasitenk.* **159**, 8, 520—526, 1953.