

УДК 616.981.25

Д. А. АГАРОНОВА, Э. Г. ШЕКОЯН, Н. П. БАБАЯН

К МЕТОДИКЕ L-ТРАНСФОРМАЦИИ СТАФИЛОКОККОВ*

Описана новая доступная и эффективная модификация метода получения L-форм стафилококков на куриных жировых яйцах.

Исследования последних десятилетий в области микробиологии показали, что знания о возбудителях инфекционных заболеваний и их роли в инфекционной патологии человека еще далеко не полны. Широкое использование антибиотиков и других препаратов без учета специфики их воздействия на возбудителя изменило клиническое течение некоторых болезней и нередко затрудняет постановку микробиологического диагноза. Эти обстоятельства обусловили появление многочисленных исследований, направленных на выявление и изучение измененных и необычных форм инфекционных агентов [2]. К таковым относятся и L-формы бактерий. Изучение L-форм бактерий вышло далеко за пределы чисто теоретических изысканий и носит все более прикладной характер. Широко дискутируется значение L-трансформации *in vivo*, способствование этого процесса возникновению хронических рецидивирующих и атипичных форм инфекционных болезней, формированию бактерионосительства, появлению атипичных вариантов бактерий с высокой лекарственной устойчивостью и т. д.

Несмотря на значительный интерес к L-формам, выделяемым из организма [1, 4, 9, 11, 13], вопрос получения L-форм микроорганизмов в условиях эксперимента продолжает оставаться актуальным.

Методы индуцирования L-трансформации описаны многими авторами [3, 5, 9, 10], однако универсальных средств для получения и пассирования L-форм разных видов бактерий не существует. Состав среды и условия культивирования зависят от вида бактерий.

В связи с тем, что приготовление оптимальных питательных сред нередко бывает сопряжено с рядом технических затруднений, мы поставили своей целью несколько модифицировать методику индукции L-трансформации.

* Работа доложена на 55-й научной сессии Ермеднститута (январь, 1977). Выдано удостоверение о рац. предложении № 20 от 14/X 1977 г.

Опыты проводились на музейном штамме золотистого стафилококка 209 р и свежевыведенных культурах от больных маститом (2 штамма) и бактерионосителей (3 штамма). Все культуры обладали гемолитическими свойствами, коагулировали цитратную плазму, обладали гиалуронидазной и лецитиназной активностью.

Сущность модификации метода заключалась в том, что первоначальная индукция L-трансформации осуществлялась путем заражения испытуемой культурой свежих жировых куриных яиц.

Предпосылкой для использования жировых яиц послужило содержание в них лизоцима (методика получения лизоцимных сферопластов была разработана в 1956 г. и используется рядом авторов) [6—8]. Известен также факт улучшения роста L-форм в присутствии яичного экстракта [11]. В качестве дополнительного индуктора L-трансформации нами использовался пенициллин [12, 14, 15].

После тщательной обработки скорлупы яйца через небольшое отверстие над воздушным мешком в желток вводилась культура стафилококка (10^8 микробных тел в объеме 0,2 мл) и пенициллин. Доза пенициллина варьировала от 250 до 1000 ед на мл содержимого яйца в зависимости от исходной чувствительности культуры к антибиотику. Зараженные яйца инкубировались в термостате при 37° 7—10 дней. По два яйца вскрывались ежедневно, начиная с 5-го дня инкубации, и содержимое (0,5—1 мл) пастеровской пипеткой переносилось в пробирки с 0,3% агаром Хоттингера, 20% нормальной лошадиной сывороткой (НЛС), NaCl—6%, 0,85 М сахарозы в качестве стабилизатора и пенициллином. Пересев производился также на аналогичную среду без пенициллина и на полужидкую среду на триптическом переваре бычьего сердца (БС) с дрожжевым гидролизатом, пенициллином и без такового.

Параллельно с опытами на жировых яйцах было проведено 4 опыта по методике, принятой в лаборатории Г. Я. Каган [10].

Результаты и обсуждение

Посевы просматривались ежедневно. Обычно на 3—4-й день инкубации в толще среды появлялись нежные полиморфные колонии: с компактным центром и ажурной периферией, колонии «В», напоминающие маленькие диски или облачко. При фазово-контрастной микроскопии обнаруживались полиморфные образования в виде крупных вакуолизированных или зернистых шаров, конгломераты причудливых форм, почкующиеся формы, пульсирующие, меняющие конфигурацию зернистые образования. Более чем в 80% случаев появление описанных форм выявлялось в препаратах, приготовленных из зараженного желтка, и в 68,3%—в первых генерациях. При последующих пересевах на средах с возрастающими концентрациями пенициллина (и без пенициллина) многие культуры подвергались аутолизу и погибали. После по-

становки 7 серий опытов стойкую L-трансформацию удалось получить в 31,9% случаев. Полученные L-формы росли на всех использованных средах с пенициллином. На средах без пенициллина культуры подвергались аутолизу либо реверсировали в исходные формы. Только 6 культур стойко пассировались, и 2 из них сохраняли L-форму на средах без пенициллина (стабильная форма).

Результаты опытов суммированы в таблице, где среда на триптическом переваре бычьего сердца условно обозначена БС; среда I-го типа содержит НЛС+пенициллин, среда 2-го типа—НЛС без пенициллина.

Таблица

Частота высеваемости L-форм стафилококка на различных средах

Высевы на среды	Пассаж через яйцо			Непосредственный посев на среды		
	общее число	положит. пробы	отрицат. пробы	общее число	положит. пробы	отрицат. пробы
БС						
1-го типа		31	63		9	17
2-го типа		2	92		1	25
Хоттингера	94			26		
1-го типа		31	63		3	23
2-го типа		2	92		1	25

В графе «непосредственный посев на среды» отражены результаты индуцирования L-трансформации по методике, принятой в лаборатории Г. Я. Каган [10].

В таблице не указаны проценты из-за относительно малых цифр, тем не менее для наглядности считаем целесообразным отметить, что процент L-трансформации на жировых яйцах составил 31,9, на среде БС—34,5. При последующих пересевах на средах Хоттингера и БС I-го типа L-формы, индуцированные на жировых яйцах, выросли на 31,9%, в то время как варианты, L-трансформированные на среде БС, при пересевах на среду Хоттингера дали рост в 11,5% случаев.

Из приведенных данных следует, что предложенная нами модификация не имеет особых преимуществ с точки зрения частоты L-трансформации, но способствует лучшей адаптации трансформированных культур на средах Хоттингера, что очень существенно для тех случаев, когда приготовление сред типа БС затруднено.

С нашей точки зрения, достоинство метода в его доступности. Проведенные исследования дают основание предполагать, что жировые яйца могут быть использованы не только для L-трансформации стафилококков, но и других видов бактерий, а также для непосредственного выделения L-форм из организма.

ՍՏԱՖԻԼՈԿՈԿԵՐԻ Լ-ՓՈԽԱԿԵՐՊՄԱՆ ՄԵԹՈԴԻ ՎԵՐԱԲԵՐՑԱԼ

Նկատի ունենալով բակտերիաների Լ—ձևերի հետազոտության արդիականությունը և որոշակի դժվարությունները *in vitro* պայմաններում Լ—փոխակերպման համար պահանջվող օպտիմալ սննդամիջավայրեր կազմելու հարցը, առաջարկվում է Լ—փոխակերպումը իրագործել չբեղմնավորված ձուկ վարակելով հետազոտվող կուլտուրայով, միաժամանակ ներարկելով պենիցիլին:

Փորձերը դրվել են ստաֆիլոկոկերի 6 շտամներով: Հետազայում փոխակերպված ստաֆիլոկոկերը աճեցվել են ձիու շիճուկ և պենիցիլինի աճող դոզաներ պարունակող խոտինգերի միջավայրում:

Առաջարկված եղանակի առավելությունը նրա արդյունավետությունն ու մատչելիությունն են:

J. A. AHARONOVA, E. G. SHEKOYAN, N. P. BABAYAN

ON THE METHODS OF L-TRANSFORMATION OF STAPHYLOCOCCI

The authors suggest a method of L-transformation of staphylococcus by infecting hen fatty eggs with corresponding culture and simultaneous injection of definite dose of penicillin. The contents of the egg ensure growth of generating L-forms, while simultaneous effect of 2 inductors of L-transformation—penicillin and lysozyme, hasten the process of their emergence.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Вульфович Ю. В., Неустроева В. В., Раскова Т. М. Вестник АМН СССР, 1976, 5, стр. 37.
2. Каган Г. Я. В кн.: Изменчивость микроорганизмов и бактериофагия. М., 1960, стр. 182.
3. Каган Г. Я., Савенкова В. Т. Ж. Микробиол., 1960, 3, стр. 55.
4. Каган Г. Я., Вульфович Ю. В., Гусман Б. С. Вестник АМН СССР, 1976, 5, стр. 41.
5. Коптелова Е. И., Миронова Т. К. Ж. Микробиол., 1968, 4, стр. 101.
6. Маринова-Петрова Р., Перевезев Н. А. Ж. Микробиол., 1969, 8, стр. 80.
7. Раданова Е. Д., Андросов В. В. Ж. Микробиол., 1971, 9, стр. 108.
8. Раданова Е. Д., Андросов В. В. Ж. Микробиол., 1971, 12, стр. 80.
9. Тимаков В. Д., Каган Г. Я. Семейство Mycoplasmataceae и L-формы бактерий. М., 1967.
10. Тимаков В. Д., Каган Г. Я. L-формы бактерий и семейство Mycoplasmataceae в патологии. М., 1973.
11. Шмелев Н. А. Вестник АМН СССР, 1976, 5, стр. 29.
12. Dienes L. J. Bact., 1948, 56, 445.
13. Gutman L. T. e. a. В кн.: L. Guze „Microbiol. protoplasts and L—forms“. Baltimor, 1968, 391.
14. Landman O. E. В кн.: L. Guze (см. [13]), 319.
15. Madoffs e. a. Ann. N. J. Acad. Sci., 1967, 143, 755.