

**ВОЗМОЖНОСТИ ОЦЕНКИ
ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ LEISHMANIA TROPICA MAJOR
В ОПЫТАХ IN VITRO**

**В. А. Серебряков, Ф. Ш. Насыров, К. А. Юсупов,
И. Т. Рокотян и В. Д. Калинин**

Узбекский институт медицинской паразитологии,
Кафедра общей гигиены Астраханского медицинского института
и Кафедра цитологии и гистологии Московского университета

На основании цитохимической характеристики промастигот лейшманий и их физиологических особенностей (факторов патогенности) предпринята попытка выяснить возможность определения вирулентности штаммов *L. tropica major* в опытах in vitro.

Вирулентность патогенных микроорганизмов, в том числе и простейших, обычно устанавливается путем заражения восприимчивых животных. Иногда большая длительность этих опытов задерживает использование испытуемых штаммов в исследовательских и практических целях. Так, в частности, обстоит дело с испытанием вирулентности штаммов *Leishmania tropica major* при отборе их для приготовления прививочного материала. Согласно принятой практике, пригодными для этой цели признаются штаммы, заражающие не менее 80% белых мышей и 90% добровольцев при инкубации 1—3 недели, наступлении изъязвления не позже 6 недель и завершении заживления не позже 3—5 месяцев от момента прививки. При этих условиях заключение о вирулентности штамма и его пригодности для прививок может быть сделано только через 4—6 месяцев от начала испытания.

При культивировании на искусственных средах вирулентность штаммов *L. tropica major* часто утрачивается очень скоро (уже на ранних пассажах), раньше, чем возможно получение ответа об их вирулентности. Это не раз служило причиной неудач при проведении массовых противолейшманиозных прививок (Белова, 1964; Родякин и др., 1965) и затрудняет борьбу с кожным лейшманиозом в очагах, где по местным условиям истребление резервуаров и переносчиков болезни не может дать стойкого эффекта, и массовые противолейшманиозные прививки выступают в роли основного фактора защиты населения (Серебряков и др., 1968). Неудачи можно было бы предупреждать, если бы была возможность контролировать вирулентность каждой последующей генерации прививочного штамма.

Мы поставили перед собой задачу выяснить принципиальную возможность оценки уровня вирулентности каждой данной генерации штаммов *L. tropica major* в непродолжительных опытах in vitro. Мы предполагали, что отдельные факторы патогенности или особенности цитохимической характеристики паразита в культуре удастся использовать в качестве индикаторов вирулентности штаммов. Для изучения было отобрано 47 штаммов *L. tropica major* разного происхождения (от больных людей — 20, от привитых — 16, от экспериментально зараженных белых мышей — 6, от большой песчанки — 1, от москитов — 4) и разного уровня виру-

лентности (высоковирулентных — 36, с ослабленной вирулентностью — 10, авирулентный — 1). Высоковирулентными мы считаем штаммы, заражающие не менее 80% белых мышей при длительности инкубации до двух месяцев (Келлина, 1967; Ни, 1969). Параллельно изучались 6 непатогенных (для млекопитающих) штаммов, выделенных от москитов (4) и каспийского геккона (2).

Среди факторов патогенности нами изучались (по общепринятым в микробиологических исследованиях методикам) гиалуронидаза по Мак-Клину в модификации Смирновой (1951), фибринолизин по Бауэр—Сморозинцеву, описанной Квашниной (1960), плазмокоагулаза по Выгодчикову (1950), фактор распространения, не идентичный гиалуронидазе по Тараториной (1947), и дермонекротоксин — внутривенным методом. Для испытания брались культуры промастигот *L. tropica major*, прошедших после выделения от источника, от 2 до 114 пассажей на среде NNN с обогащающей жидкостью (по Шевченко, 1927). Штаммы, пассированные всего один раз, не испытывались, так как после однократного пассирования не удавалось получить чистую культуру паразита. Испытывались культуры, выращенные при 22—23° в течение 6—25 суток, смытые 0.6% раствором хлористого натрия, содержащие от 100 тыс. до 200 млн промастигот в 1 мл. Для получения наиболее густых взвесей смытую культуру центрифугировали при 3100—3900 × g в течение 4 мин. (по Щеткину и Юсупову, 1969), что позволяло получать в осадке 85—95% паразитов, сохранивших характерную морфологию и подвижность. Каждая взвесь перед испытанием проверялась по обычной методике на отсутствие посторонних микроорганизмов.

Испытанию на присутствие гиалуронидазы все изучавшиеся штаммы были подвергнуты в 236 опытах, в которых, кроме густоты взвеси, варьировались длительность контакта с гиалуронозой кислотой от 15 мин. до 2 суток, температура инкубирования смеси от 22 до 37° и рН среды от 5.0 до 10.0. Испытывалось также добавление в среду суспендирования разных количеств хлористого натрия, хлористого кальция, хлористого калия и среды Хэнкса. Ни в одном случае не было обнаружено присутствия даже следов гиалуронидазы в культуре.

В 240 опытах, в которых варьировали густоту взвеси, возраст культуры и длительность контакта с плазмой, изучаемые штаммы были испытаны на присутствие фибринолизина. Интенсивность фибринолизиса оценивалась по четырехкрестовой системе. Оказалось, что фибринолитическую активность обнаруживают только высоковирулентные штаммы, причем не все (14 из 36). Установлена обратная зависимость между наличием и уровнем фибринолитической активности, с одной стороны, и длительностью пассирования штамма на среде NNN — с другой (табл. 1). Резко выраженная фибринолитическая активность у высоковирулентных штаммов обнаруживалась не позднее, чем после 3 пассажей, а после 20-го пассажа ее сохраняли лишь единичные штаммы. Наиболее четкие результаты получались при пользовании взвесью густотой 10—50 млн промастигот в 1 мл. при возрасте культуры 6—7 суток и инкубировании смеси культуры с плазмой при 37° в течение 3 суток. Как правило, фибринолизис наступал тем быстрее, чем выше была интенсивность реакции.

В специальной серии опытов мы выяснили, что высоковирулентные штаммы *L. tropica major*, утратившие фибринолитическую активность, закономерно восстанавливают ее после 2—5 пассажей на белых мышах.

На наличие плазмокоагулазы изучаемые штаммы были испытаны в 240 опытах, в которых варьировались те же условия, что и при испытании на фибринолизин. Наиболее четкие результаты получались при тех же условиях опыта, что и при испытании на фибринолизин. Среди 36 высоковирулентных штаммов плазмокоагулаза обнаружена у 20, среди 11 штаммов с ослабленной вирулентностью и авирулентных — у 3, среди 6 штаммов непатогенных лейшманий — у 3. В группе высоковирулентных штаммов отмечена обратная зависимость между наличием и выраженностью плазмокоагулирующей способности, с одной стороны, и длительностью

Таблица 1

Распределение высоковирулентных штаммов *L. tropica major*, прошедших разное количество пассажей на среде NNN, по уровню фибринолитической активности

Количество пассажей	Число исследованных штаммов	Распределение штаммов по уровню фибринолитической активности				
		-	+	++	+++	++++
2—3	8	2	1	—	—	5
4—10	13	10	2	—	1	—
11—20	10	6	1	3	—	—
21 и более	5	4	—	1	—	—
Всего штаммов	36	22	4	4	1	5

культивирования штаммов на среде NNN — с другой (табл. 2). Однако слабовирулентные и даже непатогенные штаммы обнаруживали плазмокоагулирующие свойства и после очень длительного (63—108 пассажей) пассирования на среде NNN.

На наличие фактора распространения, не идентичного гиалуронидазе, изучаемые штаммы были испытаны в 183 опытах, в которых было использовано 87 кроликов. Выраженность фактора оценивалась по величине коэффициента диффузии — соотношению площади зон распространения в коже кролика краски в смеси с культурой и в физиологическом растворе. Оказалось, что фактором распространения обладают все изученные штаммы как *L. tropica major*, так и непатогенных лейшманий, и что величина коэффициента диффузии не коррелирует ни с уровнем вирулентности штаммов, ни с длительностью их пассирования на среде NNN.

На наличие дермотоксинов изучаемые штаммы были испытаны в 183 опытах на 87 кроликах. Наряду с дермонекротическим эффектом (развитие гиперемии и инфильтрата с некротизацией кожи в месте введения культуры) учитывался и дермотоксический (только гиперемия и инфильтрат без некротизации). Дермотоксический эффект обнаружили все испытанные штаммы, хотя у высоковирулентных он был более выражен (большие размеры зон гиперемии). Дермонекротический эффект обнаружили только вирулентные штаммы; среди высоковирулентных — 18 из 36, среди штаммов с ослабленной вирулентностью — 3 из 10. По мере увеличения длительности культивирования штаммов на среде NNN их дермонекротические свойства постепенно угасают; после 26 пассажей они не обнаруживались ни разу.

Для изучения цитохимической характеристики штаммов *L. tropica major* первоначально было отобрано 6 штаммов разного происхождения и вирулентности, которые были исследованы преимущественно в фазе логарифмического роста на среде NNN при помощи 9 цитохимических реакций: на дезоксирибонуклеиновую кислоту (реакция Фельгена), рибонуклеиновые кислоты (по Браше), общий белок (по Мэзия), SH, содержащие белки (по Барнетту и Зеллигману), окрашиваемость янусом зеленым на митохондрии, цитохромоксидазу (по Муг), НАД—Н-диафоруазу (с неотетразолием по Беккеру), пероксидазу (бензидиновым методом) и гистоны. Кроме того, 7 штаммов *L. tropica major* с разным уровнем вирулентности и 3 штамма непатогенных лейшманий были изучены с помощью реакций на РНК, митохондрии и цитохромоксидазу. Детальные результаты цитохимического исследования промастигот *L. tropica major* уже пуб-

Таблица 2

Частота обнаружения плазмокоагулирующих свойств у штаммов лейшманий в зависимости от их вирулентности и длительности пассирования на среде NNN

Число пассажей	Штаммы <i>L. tropica major</i>		Штаммы непатогенных лейшманий
	высоковирулентные	слабовирулентные	
Меньше 10	$\frac{16}{24}$	—	—
От 10 до 30	$\frac{4}{10}$	$\frac{0}{2}$	—
30 и больше	$\frac{—}{2}$	$\frac{4}{9}$	$\frac{3}{6}$
Всего штаммов	$\frac{20}{36}$	$\frac{4}{11}$	$\frac{3}{6}$

Примечание. Знаменатель — число изученных штаммов, числитель — из них обнаружили плазмокоагулирующие свойства.

ликовались нами (Каллиникова и Насыров, 1972). Здесь отметим только, что ни одна из примененных цитохимических реакций не позволила выявить четких различий между высоковирулентными и слабовирулентными или авирулентными штаммами. Можно было отметить только некоторое усиление окрашиваемости паразитов янусом зеленым с утратой штаммами вирулентности.

Таким образом, единственным надежным индикатором высокой вирулентности штаммов *L. tropica major* оказалась способность к образованию фибринолизина. Правда, в отдельных случаях и высоковирулентные штаммы не обладают этой способностью. Зато у штаммов с ослабленной или утраченной вирулентностью она никогда не обнаруживается.

В дальнейшем необходимо изучение закономерностей, с которыми связана утрата и восстановление фибринолитических свойств лейшманий, чтобы рекомендуемый метод контроля прививочного материала мог быть усовершенствован.

Л и т е р а т у р а

- Белова Е. М. 1964. Изучение вирулентности различных штаммов возбудителя зоонозного кожного лейшманиоза. Мед. паразитол., 6 : 666—670.
- Выгодчиков В. Г. 1950. Микробиология и иммунология стафилококковых заболеваний. М.
- Каллиникова В. Д. и Насыров Ф. Ш. 1972. Цитохимическое изучение лейшманий в культуре. Цитология, 14 (2) : 219—226.
- Квашнина А. С. 1960. Фибринолитическая способность и ее значение в патогенном действии микроорганизмов. Автореф. докт. дисс., М.
- Келлина О. И. 1967. Изучение особенностей штаммов возбудителя кожного лейшманиоза сельского типа в связи с усовершенствованием профилактических прививок. Автореф. канд. дисс., М.
- Ни Г. В. 1969. Изучение вирулентности штаммов *Leishmania tropica* var. *major* (Yakimoff, 1915), распространенных в Узбекистане. Канд. дисс., Самарканд.
- Родякин Н. Ф., Добржанская Р. С., Кузнецова А. А. и Ханмамедов Н. М. 1965. Иммунологическая профилактика кожного лейшманиоза. Здоровоохр., Туркменист., 11 : 9—11.
- Серебряков В. А., Караходжаева С. Х., Ни Г. В., Белозорова О. Д., Сафаров Г. И. и Якубов О. Я. 1968. Первый опыт организации проведения массовых лейшманийных прививок сельскому населению. Мед. паразитол., 6 : 651—654.
- Смирнова Л. Г. 1951. Препарат гиалуроновой кислоты для определения инвазивных свойств микробов. Журн. микробиол., 10 : 52—56.
- Тараторина О. М. 1947. К вопросу о факторе распространения Дюран-Рейнальса и его значении у микробов. I. Сравнительное изучение методов определения фактора Дюран-Рейнальса у свежевыделенных штаммов микробов раннего происхождения. Журн. микробиол., 6 : 54—59.
- Шевченко И. Ф. И. 1927. К методике сохранения культур лейшманий. Мед. мысль, Узбекистан, 3 : 74—79.
- Щеткин В. Ю. и Юсупов К. А. 1969. К методике концентрации взвеси лептонад *Leishmania tropica major* и определения их концентрации. Матер. научн. конф. по пробл. мед. паразитол., Ташкент : 71—74.

ON THE POSSIBILITY OF EVALUATING THE VIRULENCE OF THE STRAINS OF LEISHMANIA TROPICA MAJOR IN THE TESTS IN VITRO

V. A. Serebrjakov, F. Sh. Nasyrov, K. A. Yusupov,
I. T. Rokotjan and V. D. Kallinikova

S U M M A R Y

An attempt was made to determine the virulence of the strains of *L. tropica major* by using their cytochemical characteristics or their physiological properties (pathogenicity factors) in culture. The ability to form fibrinolysin is the only reliable indicator of high virulence of the strains of *L. tropica major*. Rapid determination of the fibrinolytic activity allows to watch the virulence of every subsequent generation of the strains. The authors consider this test a possible criterion of selection of cultures for preparation of vaccination material in the prophylaxis of cutaneous leishmaniosis.