

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ
БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ ОРГАНИЗМА КЛЕЩЕЙ
ORNITHODOROS PAPILLIPES

В. М. Подборонов, И. М. Гроховская, А. М. Подборонов

Лаборатория переносчиков отдела инфекций с природной очаговостью
Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

Организм клещей *Ornithodoros papillipes* подавляет в опытах *in vivo* как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. Из грамположительных микроорганизмов чувствительными к бактерицидному воздействию клещей оказались микрококки, стафилококки, стрептококки и бактерии дифтерии, из грамотрицательных — бактерии кишечной палочки. Менее чувствительны из грамположительных — листерии, из грамотрицательных — сальмонеллы и возбудители туляремии и псевдотуберкулеза. При заражении бактериями в организме клещей идет выработка бактерицидного вещества — лизоцима, вызывающего отмирание микробной популяции.

В наших предыдущих сообщениях (Подборонов с соавтор., 1972а, 1972б, 1974, 1975а, 1975б) были представлены данные об антибактериальном действии организма клещей надсемейства *Ixodoidea*. В опытах *in vitro* были использованы возбудители дифтерии, сальмонеллеза, листериоза, бруцеллеза, лептоспироза, пастереллеза, туляремии (вакцинный штамм), бактерии кишечной палочки, стафилококка и стрептококка. В дальнейшем (Подборонов, 1976) в опытах *in vivo* было изучено антибактериальное действие клещей *O. papillipes* в отношении микрококка, стафилококка, сальмонелл, листерий, возбудителя туляремии и против бактерий кишечной палочки.

Целью настоящего исследования изучение *in vivo* взаимодействия клещей *Ornithodoros papillipes* со *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Pasteurella pseudotuberculosis*, сопоставление бактерицидного эффекта клещей в отношении разных видов бактерий, количественное определение активности бактерицидного вещества в зависимости от микробной нагрузки и времени после заражения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для работы были взяты 18—24-часовые культуры *Streptococcus pyogenes* ТМ-1, *Corynebacterium diphtheriae* 2841 и *Pasteurella pseudotuberculosis* 114. Питательными средами для стрептококка были мясо-пептонный агар, в который предварительно добавляли 5%-й дефибринированной кроличьей крови или сыворотки; для дифтерийного микроба — агар Хоттингера с добавлением 20%-й лошадиной сыворотки, для псевдотуберкулеза мясо-пептонный агар и мясо-пептонный бульон.

В опыт были взяты голодные половозрелые самки и самцы *O. papillipes* (через 9 мес. после кровососания). Клещей кормили через биомембрану (кожа 3—5-дневного цыпленка) кровью морской свинки, смешанной с одной из бактериальных культур. Готовили суспензии, содержащие необходимые концентрации микробных клеток с помощью оптического стандарта ЦГНКИ и последовательных разведений. Опытные разведения микробной взвеси смешивали с равным объемом гепаринизированной

крови морской свинки. Под мембрану, на которой кормились клещи подводили кровь со следующими микробными нагрузками: 100 000 и 1—2 млрд микробных клеток в 1 мл. Каждый клещ при питании выпивал до 0.1 мл бактериальной взвеси, соответственно при кормлении с нагрузкой 100 000 микробных клеток в организм одного клеща в среднем попадало 1000 микробных тел, а при кормлении кровью с нагрузкой в 1—2 млрд микробных клеток в организм одного клеща попадало $10 \cdot 10^7$ микробных тел. Из заражающей микробной взвеси параллельно с кормлением производили контрольный рассев на агаровые пластинки для уточнения концентрации микробных клеток. Кормление клещей на мембране проводили при температуре 37°.

На зараженность бактериями проверяли только полностью напитавшихся клещей. Их исследовали индивидуально сразу после заражения, через 3, 6, 12, 24, 48, 72 ч, а также через 5, 10, 15, 20, 25 и 30 суток. На каждом сроке исследовали по 5 особей. Для получения достоверных результатов опыта повторяли 2—3 раза. Зараженных через мембрану клещей перед исследованием трижды промывали в стерильном физиологическом растворе, затем погружали в 96°-й спирт, а затем снова промывали в физиологическом растворе. Отмытых клещей переносили в стерильную фарфоровую ступку, растирали индивидуально в 1 мл физиологического раствора, делали 10-кратные разведения суспензии и по 0.1 мл каждого разведения высевали на агаровые пластинки. Посевы инкубировали в термостате в течение 2—5 суток при температуре 37°, а затем подсчитывали число выросших жизнеспособных колоний. Контролем был физиологический раствор.

Была изучена активность бактерицидного вещества клещей в отношении различных видов бактерий, в зависимости от микробной нагрузки и времени после заражения клещей. Для этого клещей заражали суспензиями живых клеток *St. pyogenes*, *Cor. diphtheriae* и *P. pseudotuberculosis* в концентрации 1000 и $10 \cdot 10^7$ микробных тел на 1 особь клеща.

Активность бактерицидного вещества незараженных и зараженных особей определяли в гомогенатах целого клеща в те же сроки. Клещей промывали, добавив равное количество физиологического раствора, гомогенизировали, затем гомогенат трижды замораживали и оттаивали, центрифугировали 15 мин при 5000 об./мин. Надосадочную жидкость использовали в опыте.

Для определения активности бактерицидного вещества был применен метод диффузии в агаре по Цериотти (1964) в модификации Каграмановой и Ермольевой (1966). Бактерицидное вещество, содержащееся в исследуемой жидкости, диффундируя в стандартных условиях в агаре, лизирует оболочки мертвых клеток *M. lysodeikticus*, равномерно залитых в агаровой пластинке. В результате образуются различные зоны лизиса, по диаметру которых можно судить об активности бактерицидного вещества. Для определения концентрации бактерицидного вещества в клещах использовали стандартные разведения чистого лизоцима куриного белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что большая часть бактерий *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae* и *Pasteurella pseudotuberculosis* сразу после попадания в кишечник клещей *O. papillipes* отмирает в первые часы после заражения. При этом, чем меньше бактерий перечисленных видов попадает в организм клеща, тем быстрее клещ освобождается от них.

Наиболее чувствительными к бактерицидному воздействию клещей *O. papillipes* оказались стрептококки и возбудитель дифтерии. Так, при заражении клещей небольшой дозой стрептококка — 1000 микробных тел на 1 особь — через 3 ч число их снизилось в 31.25 раза и составляло 32 колонии, бактерий нельзя было обнаружить в клещах уже через 6 ч. При более высокой микробной нагрузке на 1 особь клеща — $10 \cdot 10^7$ микробных тел — нам удалось наблюдать сохранение стрептококков в орга-

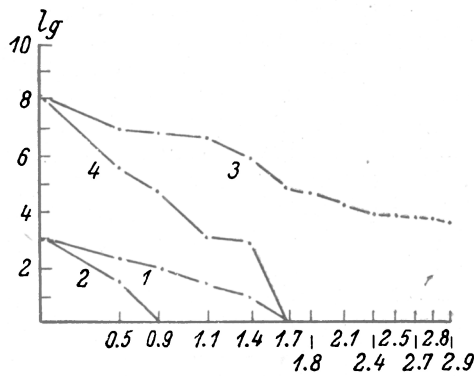


Рис. 1. Изменение числа жизнеспособных бактерий *Streptococcus pyogenes* TM-1 в организме клещей.

1 — контроль (физиологический раствор + культура 1000 микробных тел в 1 мл); 2 — клещи, зараженные 1000 микробных тел бактерий на 1 особь клеща; 3 — контроль + физиологический раствор + культура $10 \cdot 10^7$ микробных тел в 1 мл); 4 — клещи, зараженные $10 \cdot 10^7$ микробных тел бактерий на 1 особь клеща.

На рис. 1—3 по оси абсцисс — $\lg t$; по оси ординат — \lg числа жизнеспособных бактерий.

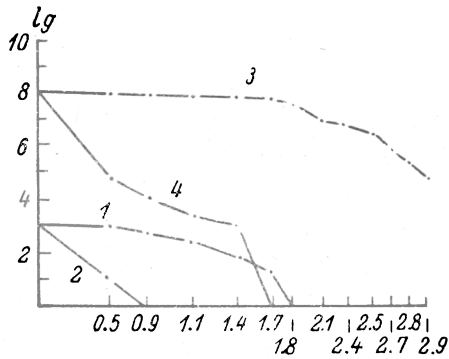


Рис. 2. Изменение числа жизнеспособных бактерий *Corynebacterium diphtheriae* 2841 в организме клещей.

Обозначения такие же, как на рис. 1.

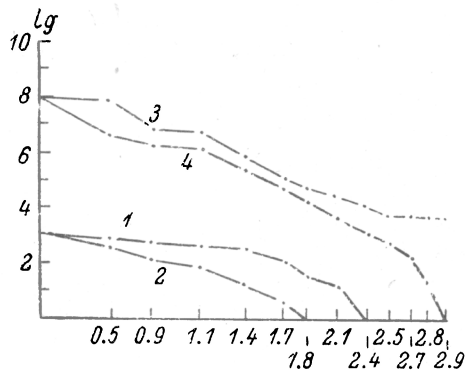


Рис. 3. Изменение числа жизнеспособных бактерий *Pasteurella pseudotuberculosis* 114 в организме клещей.

Обозначения такие же, как на рис. 1.

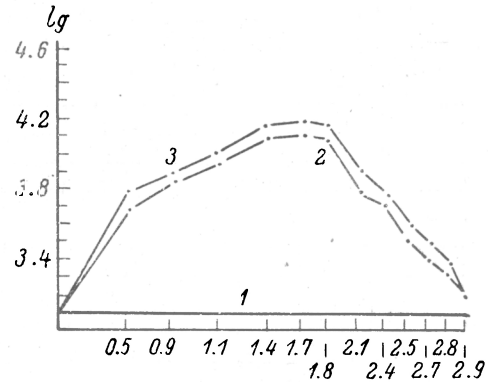


Рис. 4. Изменение концентрации лизоцима в организме клещей, зараженных культурой *Streptococcus pyogenes* TM-1.

1 — контроль (клещи, незараженные, [здоровые]); 2 — клещи, зараженные 1000 микробных тел на 1 особь; 3 — клещи, зараженные $10 \cdot 10^7$ микробных тел бактерий на 1 особь. На рис. 4—6 по оси ординат — \lg концентрации лизоцима клещей, мг/мл.

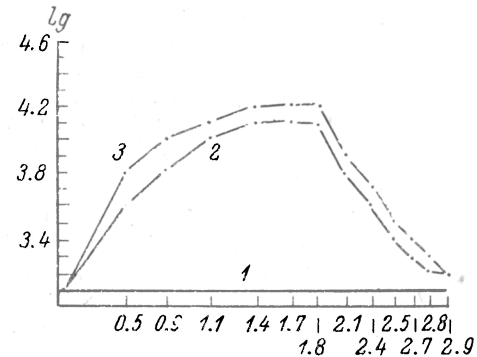


Рис. 5. Изменение концентрации лизоцима в организме клещей, зараженных культурой *Corynebacterium diphtheriae* 2841.

Обозначения такие же, как на рис. 4.

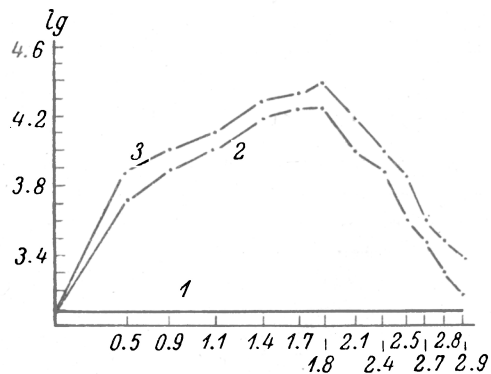


Рис. 6. Изменение концентрации лизоцима в организме клещей, зараженных культурой *Pasteurella pseudotuberculosis* 114.

Обозначения такие же, как на рис. 4.

низме клещей до 48 ч. В контроле, которым служил физиологический раствор, стрептококки сохранялись при микробной нагрузке 1000 микробных тел в 1 мл до двух суток, а при микробной нагрузке $10 \cdot 10^7$ микробных тел на 1 мл оставались жизнеспособными и не гибли в течение 30 суток (рис. 1).

Аналогичные данные получены при заражении клещей возбудителем дифтерии (рис. 2).

Бактерии псевдотуберкулеза сохранялись в организме клещей *O. papillipes* более длительное время по сравнению со стрептококками и бактериями дифтерии. При заражении клещей 1000 микробных тел на 1 особь патогенной культурой бактерии сохранялись в организме клещей до 3 суток, а при микробной нагрузке $10 \cdot 10^7$ микробных тел на 1 особь клеща до 30 суток. В физиологическом растворе бактерии возбудителя псевдотуберкулеза в указанные сроки не погибали и сохранялись при микробной нагрузке 1000 микробных тел в 1 мл до 10 суток, а при микробной нагрузке $10 \cdot 10^7$ микробных тел в 1 мл они оставались жизнеспособными и не гибли в течение 30 суток (рис. 3).

При сопоставлении этих данных с результатами бактерицидного действия клещей *O. papillipes* в опытах *in vivo* в отношении других бактерий: микрококка, стафилококка, кишечной палочки, сальмонеллы, листерий и возбудителя туляремии можно отметить, что чувствительны к воздействию антибактериального вещества клещей как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. Наиболее чувствительны к лизоцимоподобному веществу из грамположительных микроорганизмов оказались микрококки, стафилококки, стрептококки и дифтерийные палочки, из грамотрицательных — бактерии кишечной палочки. Менее чувствительны из грамположительных — листерии, из грамотрицательных — сальмонеллы и возбудители туляремии и псевдотуберкулеза. Упомянутые выше отличия в чувствительности к бактерицидному веществу можно объяснить особенностями экологии возбудителей, использованных в опытах.

Сопоставляя полученные данные с результатами опытов по изучению бактерицидного действия органов и тканей клещей *O. papillipes*, в опытах *in vitro* с теми же возбудителями можно отметить, что бактерицидный эффект в тех и других опытах совпадает (см. таблицу), кроме действия на тулярийный микроб, что свидетельствует о том, что активным действующим веществом в том и другом случаях является лизоцим. Возможно, что подавление микроба туляремии в гомогенатах шло за счет какого-то другого фермента.

При заражении клещей *O. papillipes* разными микробными нагрузками *St. pyogenes*, *Cor. diphtheriae* и *P. pseudotuberculosis* концентрация лизоцима в клеще повышается, оказывая сильное защитное действие на грамположительные и на грамотрицательные бактерии. Концентрация лизоцима в гомогенатах незараженных клещей, которые были контролем, сравнительно постоянна и достигает 1500 мкг/мл (рис. 4, 5, 6).

При заражении клещей культурой *St. pyogenes* в количестве 1000 и $10 \cdot 10^7$ микробных тел на 1 особь клеща отмечено увеличение концентрации лизоцима до 24 ч, с сохранением постоянного количества до 72—96 ч, а затем его постепенный спад (рис. 4). Аналогичные данные получены при заражении клещей *O. papillipes* патогенной культурой

Бактерицидное действие органов и тканей клещей *Ornithodoros papillipes* в отношении разных видов бактерий *in vitro*

Вид бактерий	Чувствительность бактерий
<i>M. lysodeikticus</i>	+
<i>St. aureus</i>	+
<i>St. pyogenes</i>	+
<i>Cor. diphtheriae</i>	+
<i>E. coli</i>	+
<i>S. typhimurium</i>	+
<i>Fr. tularensis</i> B—15	+
<i>L. monocytogenes</i>	—
<i>P. pseudotuberculosis</i>	—

Примечание. Плюс + подавление роста бактерий; плюс-минус — слабое подавление; минус — отсутствие бактерицидного действия.

Cor. diphtheriae (рис. 5). При заражении клещей *O. papillipes* бактериями *P. pseudotuberculosis* антибактериальная активность гомогенатов клещей была несколько выше, чем при заражении бактериями стрептококка и дифтерии (рис. 6).

При сопоставлении этих данных с данными о концентрации лизоцимоподобного вещества в клещах зараженных микрококком, стафилококком, кишечной палочкой, сальмонеллами, листериями и возбудителем туляремии отмечено аналогичное увеличение антибактериальной активности. Однако следует отметить то, что чем больше бактерий при заражении попадает в организм клеща, тем выше активность бактерицидного фактора.

При сопоставлении гибели бактерий в организме клещей с антибактериальной активностью его организма заметна связь этих явлений: чем меньше остается бактерий в организме клещей, тем меньшее количество лизоцима мы обнаруживаем в его организме.

Таким образом, нам удалось установить ингибирующее действие лизоцима клещей *O. papillipes* в отношении бактерий и увеличение его концентрации в клеще в зависимости от срока в бактерицидном действии на разные виды микроорганизмов. Защитные механизмы, действующие на бактерии в кишечнике клещей *O. papillipes*, обеспечиваются выработкой лизоцима. Лизоцим клещей активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Вероятно, лизоцим является у клещей основным антибактериальным агентом, обеспечивающим естественный и приобретенный иммунитет, так же, как это показано Моригом и Месснером (Mohrig, Messner, 1968, 1969; Powning, Davidson 1973) в отношении насекомых *Periplaneta americana*, *Galleria mellonella* и *Bombyx mori* против следующих бактерий: *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *Micrococcus lysodeikticus* и *Pseudomonas aeruginosa*.

ВЫВОДЫ

1. Организм клещей *Ornithodoros papillipes* подавляет в опытах *in vivo* как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. Из грамположительных микроорганизмов чувствительными к бактерицидному воздействию клещей оказались микрококки, стафилококки, стрептококки и бактерии дифтерии, из грамотрицательных — бактерии кишечной палочки. Менее чувствительны из грамположительных — листерии, из грамотрицательных — сальмонеллы и возбудители туляремии и псевдотуберкулеза.

2. При заражении бактериями в организме клещей идет выработка бактерицидного вещества, вызывающая отмирание микробной популяции. Способность бактерицидного вещества лизировать убитые клетки *Micrococcus lysodeikticus*, а также совпадение данных по чувствительности к клещевому бактерицидному веществу в опытах *in vitro* и *in vivo* свидетельствует о том, что активным антибактериальным веществом в организме клещей является лизоцим.

3. При заражении клещей *Ornithodoros papillipes* максимальными микробными нагрузками бактерий микрококка, стафилококка, стрептококка, дифтерии, кишечной палочки, сальмонелл, листерий и возбудителями туляремии и псевдотуберкулеза ($10 \cdot 10^7$ микробных тел на 1 особь) отмечается отмирание значительной части бактерий в первые часы после заражения и очищение клещей от микрококка, стафилококка, стрептококка и бактерий дифтерии через 24—48 ч, от бактерий кишечной палочки через 5 суток и от сальмонелл, листерий и возбудителей туляремии и псевдотуберкулеза через 15—30 суток.

4. Отмечено возрастание концентрации лизоцима, при заражении клещей бактериями, до 24 ч, сохранение постоянного количества до 72—96 ч, а затем постепенный спад его активности.

Л и т е р а т у р а

- К а г р а м а н о в а К. А., Е р м о л ь е в а З. В. 1966. Сравнительная характеристика методов определения активности лизоцима. Антибиотики, М., 10 : 917—919.
- М о р и г В., М е с с н е р Б. 1969. Значение лизоцима в антибактериальном иммунитете насекомых. Журн. общ. биол., 30 (1) : 62—71.
- П о д б о р о н о в В. М., С т е п а н ч е н о к - Р у д н и к Г. И., Г р о х о в с к а я И. М. 1972а. Изучение антибактериального действия кишечника и гемолимфы клещей Ixodoidea. Сообщ. 1. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 4 : 468—471.
- П о д б о р о н о в В. М., С т е п а н ч е н о к - Р у д н и к Г. И., Г р о х о в с к а я И. М. 1972б. Изучение антибактериального действия органов и тканей клещей семейства Ixodoidea. Сообщ. 2. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 5 : 577—581.
- П о д б о р о н о в В. М., С т е п а н ч е н о к - Р у д н и к Г. И., Г р о х о в с к а я И. М. 1974. Изучение антибактериального действия органов и тканей клещей Hyalomma asiaticum (Ixodoidea). Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 6 : 715—719.
- П о д б о р о н о в В. М., С т е п а н ч е н о к - Р у д н и к Г. И., Г р о х о в с к а я И. М. 1975а. Изучение антибактериального действия органов и тканей клещей Ornithodoros papillipes Birula. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 4 : 29—34.
- П о д б о р о н о в В. М., Г р о х о в с к а я И. М., С т е п а н ч е н о к - Р у д н и к Г. И. 1975б. Получение и свойства бактерицидного вещества, выделенного из клещей Ornithodoros papillipes. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 6 : 716—719.
- П о д б о р о н о в В. М. 1976. Действие лизоцимоподобного вещества на патогенные микроорганизмы. Тез. докл. на 3-м Всесоюз. совещ. по теоретической и прикладной акарологии, Ташкент : 193—194.
- G e r i o t t i G. 1964. 3-rd International Symposium of Fleming's lysome. Milan (Italy), April : 1—12.
- M o h r i g W., M e s s n e r B. 1968. Immunreaktionen bei Insekten. 1. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. Biologisches Zentralblatt, Leipzig, 87 (4) : 439—470.
- P o w n i n g R. F., D a v i d s o n W. J. 1973. Studies on insect bacteriolytic enzymes. — 1. Lysozyme in Haemolymph of Galleria mellonella and Bombyx mori. Comparative Biochemistry and Physiology, 45 (3B) : 669—681.

A COMPARATIVE STUDY OF THE BACTERICIDAL EFFECT OF THE TICKS ORNITHODOROS PAPILLIPES

V. M. Podboronov, I. M. Grokhovskaya, A. M. Podboronov

S U M M A R Y

Experiments in vivo have shown that the ticks of *Ornithodoros papillipes* inhibit both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Of Gram-positive microorganisms most sensitive to bactericidal effect of ticks have turned to be micrococci, staphylococci, streptococci and bacteria of diphtheria, of Gram-negative ones — *Bacillus coli*. Of Gram-positive microorganisms less sensitive were *Listeria*, of Gram-negative ones — salmonellae, agents of tularemia and pseudotuberculosis. At the infection with bacteria the organism of the tick produces a bactericidal substance which causes the dying off of the microbial population. The ability of the bactericidal substance to lyse the inhibited cells of *Micrococcus lysodeiktickus* as well as the coincidence of data on sensibility to the tick bactericidal substance obtained experimentally in vitro and in vivo have shown that lysozyme is an active antibacterial substance in the tick's organism.
