

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РИККЕТСИЙ *DERMACENTROXENUS SIBIRICUS*
В ОРГАНИЗМЕ КЛЕЩА *DERMACENTOR MARGINATUS* SULZ.
НА РАЗНЫХ ФАЗАХ ЕГО РАЗВИТИЯ

В. Н. Крючечников и В. Е. Сидоров

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи
АМН СССР, Москва

Исследовано распределение риккетсий *D. sibiricus* по органам и тканям клещей *D. marginatus* при заражении кормлением на больных животных и парентерально, а также характер диссеминации риккетсий в организме потомков зараженных клещей. Отмечена большая скорость диссеминации риккетсий в специфическом переносчике — *D. marginatus* по сравнению с изученным авторами ранее *A. lahorensis*. Обнаружены различия в проницаемости для риккетсий кишечной стенки у этих двух видов. Подчеркивается ведущая роль тканей внутренней среды и клеток кишечника в поддержании и распространении риккетсиозной инфекции в организме *D. marginatus*.

В настоящее время значительное внимание уделяется экспериментальным исследованиям характера связи патогенных для человека и теплокровных животных риккетсий с их хозяевами — клещами. Модель клещ — риккетсии представляет особый интерес ввиду пожизненного существования возбудителей клещевых риккетсиозов в инфицированном клеще и их исключительной способности передаваться трансфазово и трансвариально. Кроме того, между клещами и риккетсиями можно наблюдать все градации глубины связи и, таким образом, сравнительные исследования в этой области благоприятствуют решению общего вопроса о причинах специфичности переносчиков.

В предыдущем сообщении (Сидоров, Крючечников, 1968) излагаются результаты парентерального заражения *Alveonanus lahorensis* Neum., связь которого с риккетсиями *Dermacentroxenus sibiricus* в природе не отмечали. В представленной работе изучены особенности их распределения в организме естественного переносчика — *Dermacentor marginatus* Sulz.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали культуру *D. marginatus*, поддерживаемую в лаборатории с 1963 г. Морских свинок заражали путем интраперитонеальной инъекции 0.5 мл взвеси лиофилизированной желточной культуры штамма «Нецветаев» в стандартном разведении. Пассажи проводили на 3—4-й день после заражения по общепринятой методике. После пассажа на морских свинках заражали кормлением клещей. Для этого их подсаживали на свинок на следующий день после введения инфекционного материала (2 мл взвеси семенников и мозга в 10 мл физраствора). При этом большая часть периода питания клещей совпадала с риккетсиемией у морских свинок. Клещей заражали в личиночной, нимфальной и имагинальной фазах развития. Последующие фазы развития зараженных клещей кормили на чистых морских свинках. Таким образом, из трех опытных партий (т. е. клещей, зараженных в фазе личинки, нимфы и

имаго) исследовали до имагинальной фазы F_1 включительно. По ходу опытов зараженность клещей подтверждали в биопробах из суспензий опытных клещей на морских свинках с исследованием сывороток в РСК. Для гистологических исследований органов и тканей клещей использовали голодных и сытых особей во всех фазах развития. Самцов и самок исследовали также в различные сроки после начала питания, сытых самок — до и после яйцекладки. Анатомирование, парентеральное заражение клещей и прижизненное взятие гемолимфы осуществляли по методам, принятым в нашей лаборатории (Сидоров, Гроховская, Крючечников, 1967). Данные о локализации риккетсий в организме клещей основаны на результатах изучения мазков примерно из 600 клещей во всех фазах развития (взрослых — 473, нимфа — 85, личинок — около 100 особей). Мазки окрашивали по П. Ф. Здродовскому; готовили парафиновые срезы (1—3 мк) из органов и тканей клещей, окрашивали по Романовскому в разведении 3 : 100 при pH=7.2 (3 смены в течение 2 суток), дифференцировали в смесях ацетона и ксилола и через ксилол заливали в бальзам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При кормлении на зараженных морских свинках взрослых клещей получены следующие результаты. У самок с 4—8-го дня после прикрепления, т. е. в течение большей части периода роста и всего периода растяжения (по Балашову, 1958), в мазках из средней кишки обнаруживаются первые одиночные риккетсии. Найти риккетсии в срезах при таком малом их содержании, как правило, не удастся. Вплоть до момента отпадения (8—10-й день после прикрепления) заметного увеличения числа риккетсий в кишечнике не отмечали. Остальные органы и ткани в этот период, видимо, вообще свободны от риккетсий. На 4—6-й день после отпадения (т. е. на 12—16-й день с момента прикрепления к донору) в полости и стенках кишечника обнаруживаются риккетсии в значительных количествах. Почти одновременно и столь же быстро многочисленные риккетсии появляются в полости тела — в клетках гемолимфы и клеточных элементах рыхлой соединительной ткани. В стенках кишечника и рыхлой соединительной ткани количество риккетсий с конца 3-й недели от момента прикрепления находится на постоянно высоком уровне. К началу яйцекладки риккетсии обнаруживаются в ганглии и крупных нервных стволах. Они встречаются по всей ткани ганглия, но большие скопления находили лишь в близлежащих соединительнотканых элементах и обкладочных клетках трахей. В слюнных железах единичные палочковидные формы появляются к 14—16-му дню с момента прикрепления, но количество риккетсий возрастает медленно до момента гибели самок после яйцекладки (40—60 дней с момента прикрепления). У самцов *D. marginatus* наблюдается примерно та же общая картина распределения риккетсий, с той только разницей, что из-за прерывистости и кратковременности присасываний к донору имеют место значительные различия в сроках появления и накопления риккетсий в теле клещей среди особей, питавшихся на одном и том же животном.

Идентификацию риккетсий *D. sibiricus* в мальпигиевых сосудах и яичниках у всех без исключения *D. marginatus* на всех фазах развития затрудняют постоянно присутствующие в этих органах риккетсиоподобные симбионты (Крючечников, 1966), известные в настоящее время и для многих других видов *Ixodoidea* (Roshdy, 1964; Сидоров и др., 1966; Гроховская, Сидоров, 1967; Балашов, 1967). Симбионты *D. marginatus* весьма полиморфны, имеют тенденцию собираться в скопления внутри отдельных клеток, особенно в дистальной трети сосуда, но при этом также диффузно располагаются в цитоплазме, встречаясь по всей длине мальпигиевых сосудов. В процессе экскреции направленные в полость мальпигиевых сосудов апикальные участки клеток отрываются и содержащее их вместе с симбионтами выпадает в просвет сосуда. Поэтому сим-

бионты иногда обнаруживаются и в содержимом ректального мешка (рис. 1—3). Следует отметить, что в клетках семенников и спермиях *D. marginatus* и других изученных в этом отношении видов *Ixodoidea* (Сидоров и др., 1966) никогда не наблюдали симбионтов, равно как и патогенных риккетсий.

В мазках и срезах из зараженных кормлением личинок (продолжительность питания личинок 3—4 дня) риккетсий обнаружить не удалось, хотя биопробы, поставленные из этих личинок, дали положительные результаты.

Риккетсии находили в кишечнике и гемолимфе сытых нимф, питавшихся в этой фазе развития на зараженных морских свинках, на 2—4-й день после отпадения (продолжительность питания нимф — 5—7 дней). В этот период риккетсий также обнаруживали в секреторных альвеолах и протоках слюнных желез.

Трансфазовая передача риккетсий. У нимф, перелинявших из зараженных личинок, и у взрослых клещей, перелинявших из зараженных нимф, риккетсий обнаруживали в клетках тканей внутренней среды, секреторных и пирамидальных альвеолах слюнных желез, изредка в толще ганглия. В отдельных клетках кишечника риккетсии образовывали крупные скопления (рис. 4). Однако в других органах находили лишь их одиночные палочковидные формы. Таким образом, наиболее сильно инфицированными оказались те органы и ткани, которые по ходу линьки претерпевают наиболее значительные перестройки, а также клетки средней кишки, где в этот период происходят интенсивные преобразования, связанные с процессом пищеварения и заменой старых клеток новыми.

Трансовариальная передача риккетсий. Исследовали яйцекладки самок клещей, как зараженных в имагинальной фазе, так и получивших риккетсии от зараженных преимагинальных фаз. Поскольку в ооцитах и зрелых яйцах клещей присутствуют риккетсиеподобные симбионты, неотличимые от патогенных риккетсий, вопрос о локализации *D. sibiricus* в яйце остается открытым. Биопробы из яйцекладок дали отрицательный результат, несмотря на то что потомство, полученное из тех же кладок, оказалось зараженным.

В мазках и срезах голодных и сытых личинок, полученных в дальнейшем из яйцекладок зараженных самок, риккетсий не удалось найти. Однако эти личинки при кормлении заражали риккетсиями морских свинок; в биопробах, поставленных из суспензий голодных и сытых личинок, также выявляли заболевание у свинок, что подтверждалось положительными результатами в РСК.

Нимфы клещей F_1 по характеру распределения и накоплению риккетсий в их тканях и органах существенно не отличались от нимф, зараженных в личиночной фазе.

У взрослых клещей F_1 риккетсий находили во многих органах и тканях. Отличий между партиями клещей, зараженных в предыдущем поколении в личиночной, нимфальной и имагинальной фазах, обнаружить не удалось. Но при этом риккетсии отмечали в значительно большем количестве, чем после одной-двух трансфазовых передач. Биопробы на морских свинках из растертых взрослых F_1 (голодных и сытых) обнаружили высокие положительные титры в РСК. У взрослых F_1 (после кормления на чистых свинках) риккетсии находили во множестве почти во всех органах и тканях. Они присутствовали в клетках кишечника и в химусе половозрелых клещей (рис. 5—7). Значительные скопления риккетсий обнаруживали в клетках, отторгшихся в полость средней кишки в процессе пищеварения. Риккетсии находились в секреторных и пирамидальных альвеолах слюнных желез, причем можно было проследить все стадии выхода риккетсий из клеток секреторных альвеол в их полость вместе с секретом и в дальнейшем — в полость альвеол и слюнные протоки (рис. 8, 9). Относительно большие скопления риккетсий наблюдали в клетках гемолимфы и других элементах тканей внутренней среды.

Риккетсии были разбросаны по всей толще ганглия, хотя никогда не образовывали здесь крупных скоплений.

П а р е н т е р а л ь н о е з а р а ж е н и е. У голодных самцов и самок, зараженных парентерально риккетсиями, последних обнаруживали в значительных количествах почти во всех органах и тканях уже к 4—5-му дню после заражения. Риккетсии присутствовали в клетках гемолимфы и рыхлой соединительной ткани, в клетках, полостях, устьях и протоках альвеол слюнных желез (рис.10). Находили риккетсий и в эпителии кишечника, хотя они полностью отсутствовали в химусе. В значительном количестве риккетсии имелись в ганглии и в крупных нервных стволах, где для них характерна четкая ориентация вдоль нервных волокон (рис. 11).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Не лишено интереса сопоставление результатов с данными, полученными ранее для *Alveonasmus lahorensis* (Гроховская, Сидоров, 1966; Сидоров, Крючечников, 1968). При их заражении кормлением риккетсиями *D. sibiricus* не удалось обнаружить при микроскопировании ни в кишечнике, ни в полости тела. Вместе с тем восприятие риккетсий при кормлении, длительное хранение и передача возбудителя восприимчивым животным, а также трансвариальная передача во многих случаях имели место, что подтверждали выделением штаммов риккетсий на биопробных животных и положительной РСК. Причины этого явления пока не выяснены. При заражении кормлением на больном животном специфического переносчика риккетсий — клеща *D. marginatus* — риккетсий с легкостью обнаруживали в просвете и стенках средней кишки, а также во многих других его органах. При этом генерализация инфекции во всем организме клеща наступает столь быстро, что едва удается выявить разницу в сроках появления риккетсий в кишечнике и в полости тела клеща.

При парентеральном заражении *Alv. lahorensis* риккетсий обнаруживали в тканях внутренней среды в более поздние сроки (различия составляют в среднем 2—3 суток с момента заражения), а накопление риккетсий в отдельных органах (в частности, в слюнных железах) происходило в значительно меньших количествах, чем у *D. marginatus*.

Следует отметить, что применение двух методов заражения (кормлением и парентерально) позволило выявить различия в степени проницаемости кишечника для риккетсий у этих видов клещей. В то время как у *D. marginatus*, распространенного переносчика *D. sibiricus* в природе, — риккетсии с легкостью преодолевают «кишечный барьер» в обоих направлениях, у *Alv. lahorensis* это осуществляется с большим трудом и лишь в направлении просвет кишечника—полость тела. Миграции риккетсий *D. sibiricus* из полости тела в кишечник при парентеральном заражении для голодных *Alv. lahorensis* обнаружить не удалось.

Присутствие риккетсий в просвете кишечника любых зараженных клещей во всех случаях представляет собой временное явление. Риккетсии находятся в просвете кишечника лишь в период их поступления с кровью животного, а затем могут попадать туда вторично при разрушении отторгающихся от кишечной стенки пищеварительных клеток.

Независимо от фазы, в которой заражали кормлением *D. marginatus*, при питании последующих фаз на чистых свинках число риккетсий в полости тела и стенках кишечника заметно возрастает. Это можно объяснить как активизацией размножения и накоплением риккетсий при питании и линьках, так и реинфекцией клещей в процессе последующих кормлений на чистых свинках (Price, 1954). Фактическое значение этих двух явлений необходимо выяснить в дальнейшем.

ВЫВОДЫ

1. При естественном способе заражения *D. marginatus* риккетсии *D. sibiricus* быстро проникают из просвета средней кишки в клетки кишечника и, преодолев кишечную стенку, в полость тела, где активно размножаются в клетках соединительной ткани с последующей диссеминацией по всем органам. Передачу риккетсий последующим фазам развития и второй генерации клещей удалось проследить по данным гистологического анализа.

2. Ведущую роль в поддержании и распространении риккетсиозной инфекции в клещах играют элементы тканей внутренней среды. В отличие от неспецифического хозяина — *Alv. lahorensis* — клетки эпителия средней кишки *D. marginatus* также являются одним из основных «депо» риккетсиозной инфекции.

3. Наблюдаются заметные различия в проницаемости для риккетсий кишечной стенки у *D. marginatus* и изученного ранее *Alv. lahorensis*, которые можно рассматривать как один из факторов, определяющих характер связи клеща с риккетсиями и дальнейшую судьбу риккетсий в организме клещей.

4. У зараженных кормлением на больном животном *D. marginatus* после трансфазовой передачи происходит дальнейшая генерализация риккетсиозной инфекции в их теле.

Л и т е р а т у р а

- Б а л а ш о в Ю. С. 1958. Особенности питания иксодовых клещей. Паразитол. сб. ЗИН АН СССР, 18 : 78—109.
- Б а л а ш о в Ю. С. 1967. Взаимоотношения клещей надсемейства Ixodoidea и риккетсий рода Wolbachia. Паразитол. сб. ЗИН АН СССР, 23 : 8—18.
- Г р о х о в с к а я И. М. и С и д о р о в В. Е. 1966. О взаимной адаптации клещей *Ornithodoros lahorensis* Neum. и возбудителя клещевого сыпного тифа (*Dermacentroxenus sibiricus*). Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 6 : 133—138.
- Г р о х о в с к а я И. М. и С и д о р о в В. Е. 1967. Клещи Ixodoidea и *Dermacentroxenus sibiricus* (экспериментальные исследования). В сб.: Биологические взаимоотношения кровососущих членистоногих с возбудителями болезней человека. Изд. «Медицина», М. : 104—125.
- К р ю ч е ч н и к о в В. Н. 1966. Риккетсии *Dermacentroxenus sibiricus* в клещах *Dermacentor marginatus* Sulz. и *Ornithodoros lahorensis* Neum. Первое акаролог. совещ. Тез. докл., изд. «Наука», М.—Л. : 114—115.
- С и д о р о в В. Е., Г р о х о в с к а я И. М. и К р ю ч е ч н и к о в В. Н. 1966. Сравнительное изучение биологических взаимоотношений между риккетсиями и клещами надсемейства Ixodoidea. Первое акаролог. совещ. Тез. докл., изд. «Наука», М.—Л. : 189—190.
- С и д о р о в В. Е., Г р о х о в с к а я И. М. и К р ю ч е ч н и к о в В. Н. 1967. Поддержание штаммов риккетсий *Dermacentroxenus sibiricus* на клещах *Ornithodoros lahorensis* Neumann. Мед. паразитол., 3 : 323—327.
- С и д о р о в В. Е. и К р ю ч е ч н и к о в В. Н. 1968. Распределение риккетсий *Dermacentroxenus sibiricus* в организме клеща *Ornithodoros lahorensis* Neumann (= *Alveonassus canestrinii* Birula). Мед. паразитол., 3 : 306—309.
- P r i c e W. H. 1954. The epidemiology of Rocky mountain spotted fever. II. Studies on the biological survival mechanism of *Rickettsia rickettsii*. Amer. J. Hyg., 160 : 292—319.
- R o s h d y M. A. 1964. Rickettsia-like simbiotes in ticks. Acarologia, 6 (Hors. ser.) : 279.

THE DISTRIBUTION OF *DERMACENTROXENUS SIBIRICUS* IN THE ORGANISM OF *DERMACENTOR MARGINATUS* SULZ. IN DIFFERENT STAGES OF ITS DEVELOPMENT

V. N. Kruchechnikov and V. E. Sidorov

S U M M A R Y

It has been studied the distribution of *Dermacentroxenus sibiricus* in the organism of their specific host *Dermacentor marginatus* Sulz. in all phases of the development at the infestation by feeding on animals and parenterally. The distinctions in overcoming for *Dermacentroxenus sibiricus* of the «intestine bar» in *D. marginatus* and the earlier investigated *Alveonassus lahorensis* Neum. are discussed.

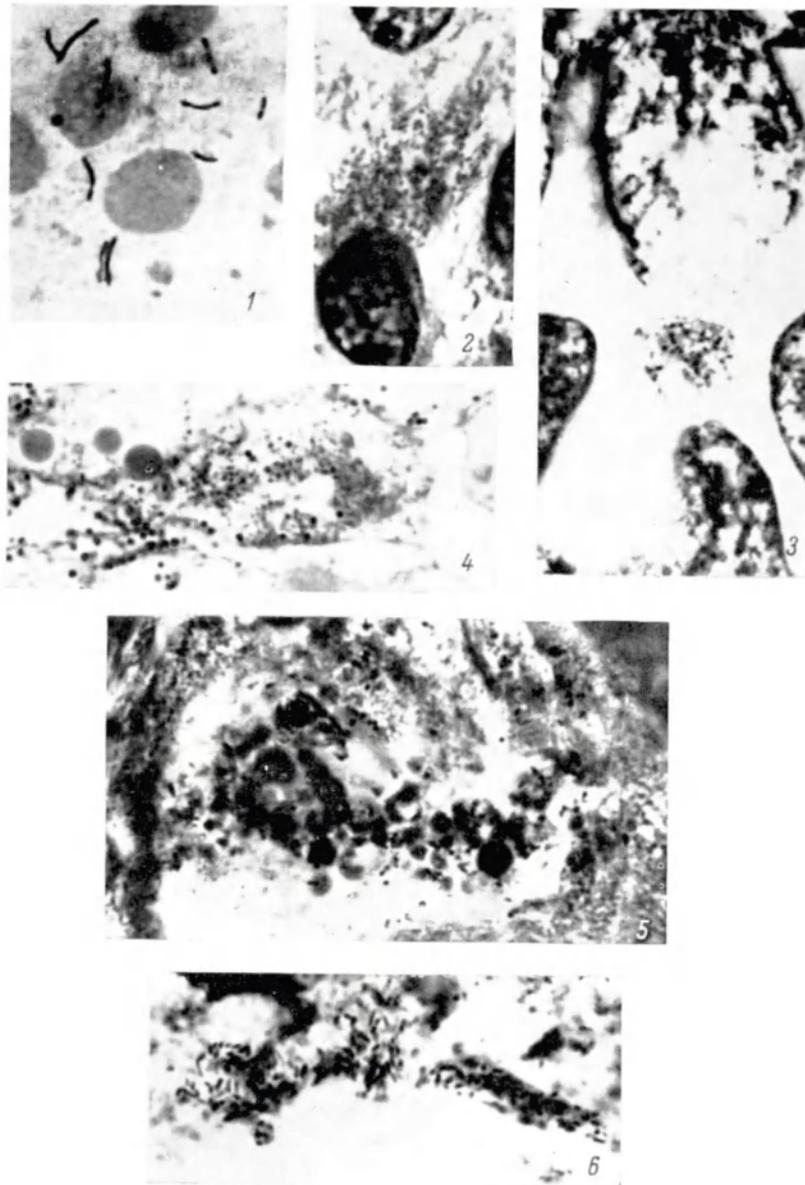


Рис. 1. Риккетсиоподобные симбионты в яичнике. Мазок. Фиксация на пламени. Окраска по Здродовскому. Общ. ув. $\times 1680$.

Рис. 2. Риккетсиоподобные симбионты в клетках мальпигиева сосуда. Срез. Фиксация по Буэн-Дюбоск-Бразиллю. Окраска по Романовскому. Общ. ув. $\times 1120$.

Рис. 3. Риккетсиоподобные симбионты в просвете мальпигиева сосуда. Срез. Фиксация по Буэн-Дюбоск-Бразиллю. Окраска по Романовскому. Общ. ув. $\times 1120$.

Рис. 4. Риккетсии *D. sibiricus* в стенке средней кишки голодной самки, зараженной в нимфальной фазе. Срез. Фиксация по Буэн-Дюбоск-Бразиллю. Окраска по Романовскому. Общ. ув. $\times 1120$.

Рис. 5. Риккетсии *D. sibiricus* в кишечном содержимом сытой самки F_1 , зараженной в предыдущем поколении в нимфальной фазе. Срез. Фиксация по Буэн-Дюбоск-Бразиллю. Окраска по Романовскому. Общ. ув. $\times 1120$.

Рис. 6. Риккетсии *D. sibiricus* в стенке кишечника сытой самки F_1 , зараженной в предыдущем поколении в личиночной фазе. Срез. Фиксация по Буэн-Дюбоск-Бразиллю. Окраска по Романовскому. Общ. ув. $\times 1120$.

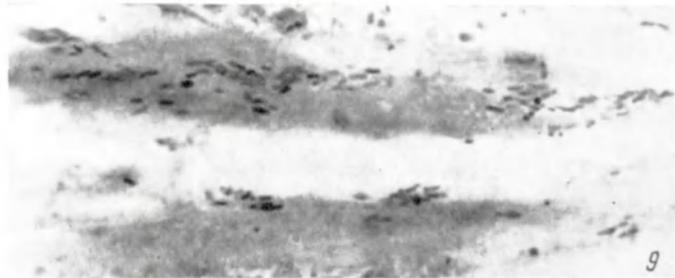


Рис. 7. Риккетсии *D. sibiricus* в клеточках кишечного эпителия сытой самки F_1 , зараженной в предыдущем поколении в нимфальной фазе. Срез. Фиксация по Буэн-Дюбоск-Бразилю. Окраска по Романовскому. Общ. ув. $\times 1120$.

Рис. 8. Риккетсии *D. sibiricus* в слюнной железе самца F_1 , зараженного в нимфальной фазе. Мазок. Фиксация на пламени. Окраска по Здродовскому. Общ. ув. $\times 1120$.

Рис. 9. Риккетсии *D. sibiricus* в секреторной альвеоле слюнной железы самки F_1 , зараженной в нимфальной фазе. Срез. Фиксация по Буэн-Дюбоск-Бразилю. Окраска по Романовскому. Общ. ув. $\times 1120$.

Рис. 10. Риккетсии в пирамидальной альвеоле голодной самки. 14-й день после парентерального заражения. Срез. Фиксация 10% формалином. Окраска по Романовскому. Общ. ув. $\times 1120$.

Рис. 11. Риккетсии в нервном стволе голодной самки. 14-й день после парентерального заражения. Мазок. Фиксация на пламени. Окраска по Здродовскому. Общ. ув. $\times 1120$.