

УДК 576.895.775 : 576.851.45

ПАТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ЧУМНОГО МИКРОБА НА ОРГАНИЗМ
БЛОХИ *XENOPSYLLA CHEOPIS*
И УЛЬТРАСТРУКТУРА ВОЗБУДИТЕЛЯ
В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ПРЕБЫВАНИЯ В ПЕРЕНОСЧИКЕ

Н. П. Коннов, Т. А. Демченко, П. И. Анисимов,
К. И. Кондрашкина А. Д. Лукьянова

Электронно-микроскопическое изучение желудочно-кишечного тракта блохи *Xenopsylla cheopis*, зараженного возбудителем чумы, показало пути проникновения чумного микроба в эпителий желудка насекомого и деструкцию последнего. Обнаружены микробы чумы за пределами желудочно-кишечного тракта насекомого. В зависимости от сроков пребывания чумного микроба в блохе показан значительный полиморфизм возбудителя.

Анализ исследований взаимоотношений блох с возбудителем чумы, полученных в разное время, свидетельствует об отсутствии единого мнения о патогенном воздействии чумного микроба на организм переносчика. При этом одна группа авторов (Тифлов, 1960; Новокрещенова, 1973; Козлов, 1979) расценивает пребывание возбудителя чумы в организме переносчика как безвредное для организма блохи, другая группа исследователей считает, что чумной микроб является патогенным для них (Кондрашкина, 1969; Бибилова, Классовский, 1974).

Однако все исследователи единодушно отмечают то обстоятельство, что возбудитель чумы наносит вред организму заблокированного переносчика.

Вопрос о патогенном действии микроба чумы на организм неблокированных насекомых остается до сегодняшнего времени открытым. Следует отметить, что действие чумного микроба на организм блохи не является односторонним. Под влиянием различных факторов организма блохи наблюдается усиление степени полиморфизма микроба. По данным Бейер и других (1974), Бейер (1979), Ващенко, Тараканов (1977), Ващенко и других (1980), Щедрина и других (1975), степень изменения морфологии возбудителя зависит от сроков его пребывания в организме переносчика и от фазы переваривания крови насекомого.

Целью нашего исследования было электронно-микроскопическое изучение взаимодействия чумного микроба с организмом неблокированной блохи *X. cheopis* с одновременным анализом ультраструктуры бактериальных клеток в различные сроки пребывания в переносчике.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Молодых не питавшихся до эксперимента самок и самцов *X. cheopis* заражали кормлением на белых мышах, находящихся в стадии предагональной бактериемии, вызванной высоковирулентным штаммом чумного микроба 231, характеризующимся полным набором детерминант вирулентности, LD₅₀ которого была равна 20 м. к. При этом в мазках крови мышей было отмечено 20—30 биополярно окрашенных микроорганизмов в поле зрения светового микроскопа. Исходная зараженность блох составляла 92 %. Блох содержали в пробирках с песком, помещенных в эксикатор при температуре воздуха 21 °С и влажности 97 %.

Для исследования желудочного тракта в электронном микроскопе эктопаразитов брали через 1, 3 ч и в дальнейшем каждые сутки в течение 11 дней. Зараженных блох через два дня на 3-й, подкармливали на здоровых белых мышах. Отбирали блох после каждой подкормки. Легким эфирным наркозом блох обездвиживали и под микроскопом МБС-2 отделяли желудочно-кишечный тракт в капле физиологического раствора. Затем его помещали в фиксатор Шёнстранда рН 7.2—7.4 на 1.5—2 ч, обезвоживали спиртами в возрастающей концентрации и пропиленоксиде. Обезвоженный материал помещали в эпоксидные смолы (Sprigg, 1969). Готовили ультратонкие срезы на ультратоме LKB 8800 (Швеция) и монтировали их на медные сеточки с формваровой подложкой. Срезы контрастировали в 1.5 %-ном растворе уранилацетата и цитрата свинца по методу Рейнольдса (Reynolds, 1963). Полученные препараты просматривали в электронных микроскопах EM-7A и HU-12A (Япония) при ускоряющих напряжениях 80 и 75 кв соответственно. Фотографировали на ядерные пластинки типа МР или фототехническую пленку ФТ-41 и ФТ-101. Всего было исследовано 40 препаратов блох.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При электронно-микроскопическом исследовании желудочно-кишечного тракта зараженных блох обнаружено, что через час и 3 ч после заражающего кормления бактерии чумы поодиночно (или по 2—3) располагались среди форменных элементов крови в преджелудочке и желудке насекомого (рис. 1, а, б; см. вкл.).

Бактериальные клетки в этот период имели палочковидную или овоидную форму. Они были окружены двумя мембранами: наружной и внутренней — цитоплазматической. Наружная мембрана имела асимметричный профиль за счет большей толщины и большей электронной плотности ее внешнего слоя. Базальная мембрана (пептидогликан) между обеими мембранами не выявлялась. Однако у всех наблюдаемых бактерий было увеличено периплазматическое пространство по сравнению с ультраструктурой чумного микроба, выращенного на искусственной питательной среде (Коннов и др., 1975). Слоистость цитоплазматической мембраны наблюдалась редко и только на полюсах бактерий. В отдельных клетках внутреннее содержимое цитоплазмы было заполнено большим количеством рибосом. Нуклеоид чаще занимал центральную часть бактериальной клетки и просматривался в виде зоны, свободно пропускающей электроны.

Обилие микробов, изменение их ультраструктуры в значительной степени зависело от сроков, прошедших после заражения и подкормок.

Через сутки и в дальнейшем на протяжении 6—7 сут бактериальные клетки чумы обнаруживали в основном в преджелудке и редко — в передней части желудка насекомого.

На 2-е сут после 2-й подкормки (8-е сут после заражающего кормления) бактерии чумы образовывали скопления в преджелудке и в средней кишке насекомого в массе гематина — конечного продукта переваривания крови (Щедрин и др., 1975; Ващенко, Тараканов, 1977; Ващенко и др., 1980), который на ультратонких срезах после окрашивания солями тяжелых металлов просматривается в виде электронноплотных зерен (рис. 1, в). Концентрация гематина вокруг бактериальных клеток увеличивается после 3-й подкормки (11-е сут). Гематин концентрируется с внешней стороны скопления бактерий, образуя конгломераты, содержащие в своем составе как бактерии чумы, так и остатки переваренной крови (рис. 1, в). В плоскости среза такого конгломерата насчитывается до 100 и более бактерий.

На ультратонких срезах можно видеть, что большинство бактериальных клеток теряют палочковидную форму, округляются, а некоторые значительно увеличиваются в размерах (рис. 1, д, е), т. е. наступают изменения, сопровождающие процесс образования протопластов или сфероластов у бактерий. У таких клеток наружная мембрана обычно сильно отстает от цитоплазматической и тогда между ними значительно увеличивается периплазматическое пространство. На периферии цитоплазмы у сфероластов видны вакуоли, ограниченные мембраной (рис. 1, д).

Однако основная масса бактериальной популяции выглядела в виде мелких бактерий размером 500—450 нм. Они имели четко выраженное различие форм. Асимметричность внешней мембраны у большинства бактериальных клеток в этот период сохраняется. Периплазматическое пространство приобретает умеренную электронную плотность, и на общем фоне просматриваемых снимков клеточная стенка микроба охватывает бактериальное тело четко выраженным ободком (рис. 1, з). В поле зрения, кроме того, встречаются делящиеся формы бактерий.

Следует отметить, что компактность выявленных конгломератов может быть нарушена, что несомненно приводит к распространению возбудителя в желудочно-кишечном тракте насекомого. Нарушение целостности ограничивающего слоя, по всей вероятности, может быть вызвано не только перистальтической активностью желудка, но и поступлением новой порции крови (при подкормке) или действием протеолитических ферментов самого микроба.

Обилие микробов чумы в желудочно-кишечном тракте переносчика в период 8—11-х сут, после заражающего кормления (2-е сут после 2-й и 3-й подкормок) позволило наблюдать динамику взаимодействия бактерий чумы с клетками эпителия желудка блохи.

Как видно из рис. 2, а (см. вкл.), возбудитель чумы способен вызывать расслоение эпителиальных клеток желудка насекомого и проникать в организованное им пространство. В дальнейшем чумной микроб, разрушая клеточную мембрану эпителиальной клетки и внедряясь в ее цитоплазму, вызывал деструкцию внутриклеточных органелл (рис. 2, б). В цитоплазме эпителиальных клеток в местах расположения чумного микроба вокруг бактериального тела просматриваются электроннопрозрачные зоны (рис. 2, в). В некоторых случаях можно было обнаружить, что возбудитель чумы отслаивал эпителиальную клетку от базальной мембраны и даже разрушал ее (рис. 2, г). Более детальный анализ базальной мембраны позволил выявить места разрыхления и нарушения ее целостности, что, по всей видимости, может способствовать проникновению чумного микроба за пределы желудочно-кишечного тракта (рис. 2, д).

Ультраструктура возбудителя чумы, взаимодействующего с эпителием желудочно-кишечного тракта, во многом идентична ультраструктуре бактерий, наблюдаемых нами в первые часы после заражающего кормления.

При изучении желудочно-кишечного тракта у незараженных блох (контрольная группа насекомых) с аналогичными временными интервалами подкормок и забора материала, как и у опытных эктопаразитов, была выявлена интактная структура эпителия желудочно-кишечного тракта переносчика (рис. 2, е).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании электронно-микроскопического исследования зараженных неблокированных блох *Xenopsylla cheopes* можно считать, что в желудочно-кишечном тракте блохи на 2-е сут после 2-й и 3-й подкормок (8—11-е сут после заражающего кормления) образуются компактные скопления конгломераты бактерий чумы в массе гематина с четко выраженным изменением формы бактерий. Это обстоятельство было отмечено в светооптических исследованиях (Бейер и др., 1974) и с применением гистологических методов (Щедрин и др., 1975; Ващенко, Тараканов, 1977; Ващенко и др., 1980).

«Замурованные» в конгломераты чумные бактерии имели структуру овоидов, палочковидных форм, сферопластов и протопластов. Такие изменения морфологии чумного микроба косвенно определяют изменения ряда функциональных особенностей самих бактерий, связанных с приспособительной реакцией на меняющиеся условия среды обитания. Формирование конгломератов бактерий, осумкованных гематиновым веществом, по всей вероятности, способствуют блокообразованию.

В период интенсивного размножения возбудителя чумы в блохе (8—11-е сут после заражающего кормления) нами в одном из трех исследуемых препаратов обнаружены структурные изменения эпителиальных клеток и базальной мембраны желудка насекомого. Они выражались в деструкции плазматической мембраны и проникновении чумного микроба в эпителий средней кишки экто-

паразита, с дальнейшим разрушением органелл эпителиальных клеток и сопровождалось выходом бактерий за пределы желудочно-кишечного тракта блохи, что свидетельствует о патогенном действии бактерий чумы в отношении тканей блохи.

Ультраструктура клеток чумного микроба, участвующего в деструкции желудочно-кишечного тракта блохи, не отличалась от ультраструктуры бактерий, наблюдаемых нами в интервале 1, 3 ч после заражающего кормления.

Л и т е р а т у р а

- Бейер А. П., Акиев А. К., Суворова А. Е. Морфология вирулентного чумного микроба в организме блох *Xenopsylla cheopis*. — Пробл. особо опасных инфекций. Саратов, 1974, вып. 6 (40), с. 60—63.
- Бейер А. П. К характеристике фенотипической изменчивости чумного микроба в блохе. — Автореф. канд. дис. Саратов, 1979. 12 с.
- Бибилова В. А., Класовский Л. Н. Передача чумы блохами. М. «Медицина», 1974, с. 67—77.
- Ващенко В. С., Тараканов Н. Ф. Влияние пищеварительного процесса на переживание возбудителя чумы в блохах *Xenopsylla gerbilli minax*. — Паразитология, 1977, т. 11, вып. 6, с. 474—479.
- Ващенко В. С., Якуба В. Н., Маевский М. П. Гистологическое исследование блох *Xenopsylla cheopis*, зараженных чумными микробами улэгейского подвида *Jer-sinia pestis olegeica*. — Паразитология, 1980, т. 14, вып. 4, с. 326—332.
- Козлов М. П. Чума. М., Медицина, 1979, с. 60—72.
- Кондрашкина К. И. Болеют ли блохи чумой? — Пробл. особо опасных инфекций. Саратов, 1969, вып. 5, с. 212—222.
- Коннов Н. П., Анисимов П. И., Синичкина А. А. Субмикроскопическая структура клеточной стенки возбудителя чумы. — Пробл. особо опасных инфекций. Саратов, 1975, вып. 1 (41), с. 78—82.
- Новокрещенова Н. С. К вопросу о патогенности микроба чумы для блох в связи с их эпидемиологическим значением. — Пробл. особо опасных инфекций. Саратов, 1973, вып. 1 (29), с. 11—17.
- Тифлов В. Е. Значение блох в распространении болезней. — Тр. научн. исслед. противочумного ин-та Кавказа и Закавказья. Ставрополь, 1960, вып. 4, с. 15—36.
- Щедрин В. И., Бейер А. П., Локтев П. А., Акиев А. К. Морфологическое и гистологическое изучение блох *Xenopsylla cheopis* Roths., зараженных чумными микробами. — Мед. паразитол., 1975, т. 40, вып. 4, № 1, с. 86—89.
- Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. — J. Cell Biol., 1963, vol. 17, p. 208—212.
- Sprue A. R. A low-viscosity epoxy embedding medium for electron microscopy. — J. Ultrastruct. res. 1969, vol. 26, p. 31—43.

Всесоюзный научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
Саратов

Поступила 10 I 1984

PATHOGENIC EFFECT OF PLAGUE MICROBE ON THE FLEA XENOPSYLLA CHEOPIS AND ULTRASTRUCTURE OF THE AGENT DURING DIFFERENT PERIODS OF ITS STAY IN THE VECTOR

N. P. Konnov, T. A. Demchenko, P. I. Anisimov, K. I. Kondrashkina,
A. D. Lukjanova

S U M M A R Y

Pathology of gastro-intestinal tract of *Xenopsylla cheopis* fleas infected with plague microbe was determined by means of electron microscopy. Ultrastructure of plague microbe during different periods of its stay in the vector was studied.

Вклейка к ст. Н. П. Коннова, Т. А. Демченко и др.

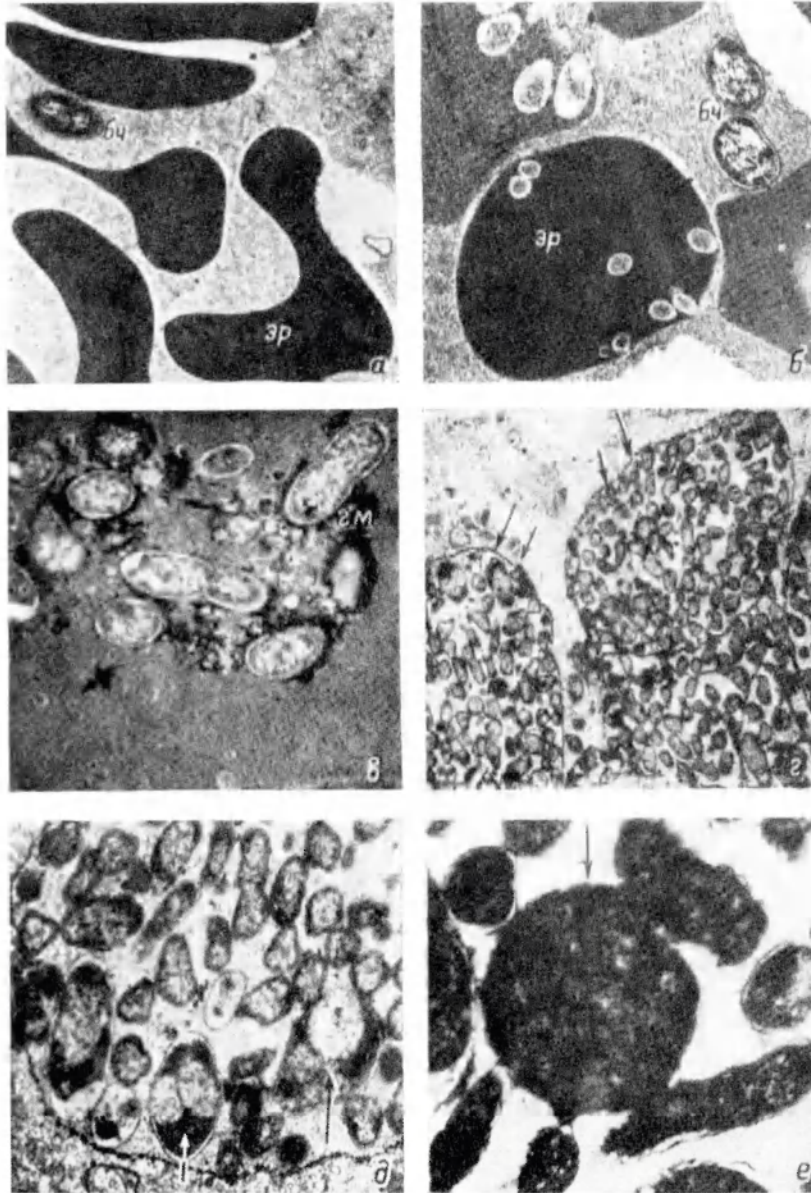


Рис. 1. Ультратонкие срезы желудочно-кишечного тракта блох *Xenopsylla cheopis*.
 а — бактерии чумы среди форменных элементов крови через час после заражающего кормления, $\times 12\ 750$;
 б — то же после 3 ч, $\times 11\ 700$; в — микробы чумы на 2-е сут после 2-й подкормки (8-е сут после заражающего кормления), видны скопления гематина вокруг бактерий чумы, $\times 13\ 500$; г — образование конгломератов (указаны стрелкой) бактерии чумы на 2-е сут после 3-й подкормки (11-е сут после заражающего кормления), $\times 5000$; д — полиморфизм бактерий в эти же сроки (стрелки — сферопласты бактерий), $\times 13\ 000$;
 е — то же, стрелка — протопласт чумного микроба, $\times 27\ 000$.

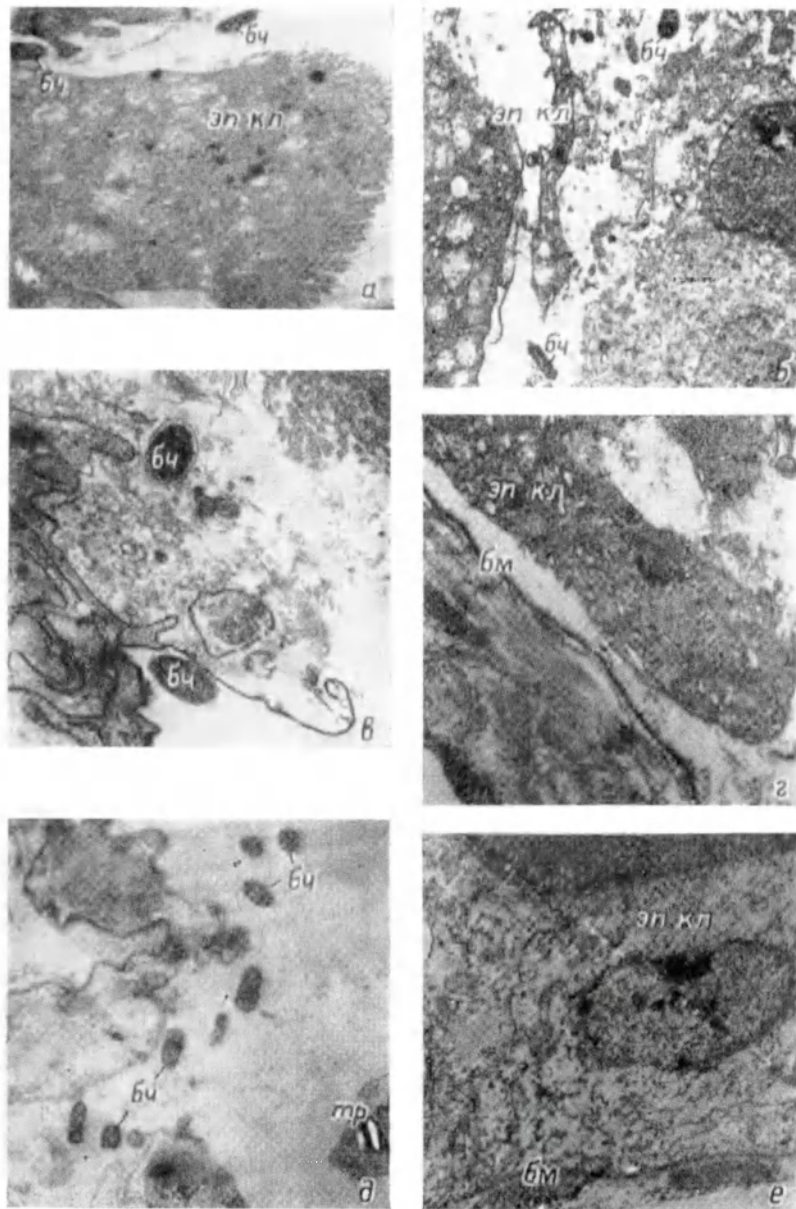


Рис. 2. Ультратонкие срезы желудочно-кишечного тракта блох *Xenopsylla cheopis*.
 а — проникновение бактерий чумы в межклеточное пространство эпителия в период 8—11-х сут после заражающего кормления (2-е сут после 2-й и 3-й подкормок), $\times 6600$; б, в — разрушение эпителиальной клетки (те же сроки); $\times 6800$, $\times 14\ 000$; г — отслоение деструктурированной эпителиальной клетки от базальной мембраны (те же сроки), $\times 15\ 000$; д — бактерии чумы за пределами желудочно-кишечного тракта блохи, $\times 10\ 400$. е — ультратонкий срез желудочно-кишечного тракта незараженной блохи *X. cheopis* (контроль). Видна интактная структура эпителия желудочно-кишечного тракта насекомого, $\times 12\ 000$.