

## МОДЕЛИРОВАНИЕ МОНО И БИНАРНОГО НОСИТЕЛЬСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕЩЕЙ *HYALOMMA ASIATICUM*

### THE MODELLING OF MONO AND BINARY BACTERIAL BURDEN USING TICKS *HYALOMMA ASIATICUM*

В.М.Подборонов

V.M.Podboronov

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАМН, ул. Гамалеи, 18, Москва 123098, Россия

Gamaleya Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Science of Russia, Gamaleya, 18, 123098 Moscow, Russia

Ключевые слова: иксодовые клещи, модельный объект, бактерионосительство

Key words: ticks, model object, bacterial carrying

#### РЕЗЮМЕ

Полость тела голодных половозрелых клещей *Hyalomma asiaticum* способна сохранять в течение месяца возбудителей сальмонеллезной и шигеллезной инфекций, а также условно-патогенных бактерий *Kl.pneumoniae*. Организм клеща является благоприятной средой и для авирулентного штамма *E.coli*, персистирующего в полости тела как изолированно, так и в смеси со штаммом *S.typhimurium* в отношении 1:1. Бинарное бактерионосительство у голодных клещей позволяет выявить на этой модели антагонистические взаимоотношения культур в условиях резкого снижения иммунитета.

#### ABSTRACT

In the body cavity of unfed adult ticks *Hyalomma asiaticum* are capable to preserve for a month. The agents of salmonellosis and shigellosis infections as well as conditionally pathogenic bacteria *Kl.pneumoniae*. The ticks as model object is also a favourable medium for the avirulent *E.coli* strain that is persistent in the body cavity either in isolated state or mixed with strain of *S.typhimurium* in proportion 1:1. Mixed bacterial carrying in unfed ticks will make it possible to reveal the antagonistic interrelations between cultures in the conditions of a sharp decrease in immunity of ticks.

Моделирование персистирующей антропонозной инфекции, а также инфекции, вызываемой условно-патогенными бактериями, связано с трудностями длительного подавления колонизационной резистентности организма лабораторного животного. Традиционное использование для этих целей гнотобионтов по-прежнему сопряжено со сложностями их изоляционного содержания. Поиск новых биологических моделей с контролируемым микробным ценозом стал необходим и для исследования механизмов управления составом микробного

сообщества, особенно условий элиминации определенных групп микроорганизмов на фоне вторичного иммунодефицита.

Известно, что полость тела голодных клещей характеризуется как скудным белково-клеточным составом, так и сниженным содержанием лизоцима [Алексеев, Кондрашова, 1985; Podboronov, 1991; Подборонов В., Подборонов А., 1993] и может рассматриваться как иммунодефицитная система.

Цель работы — изучение возможности использования полости тела голодных клещей в качестве резервуара инфекции при их моно- и биассоциации с различными видами энтеробактерий.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использованы 18 ч агаровые культуры бактерий с типичными видовыми культурально-биохимическими свойствами:

- 1) вирулентные штаммы *Salmonella typhimurium* № 415, *Shigella flexneri* 2a № 516;
- 2) штамм *Klebsiella pneumoniae* K<sub>13</sub> № 1470;
- 3) штамм *Escherichia coli* O<sub>140</sub> № 3/90.

Работа проводилась с голодными клещами *Hyalomma asiaticum*. Перед инфицированием устанавливали стерильность клещей. Для этого из каждой партии клещей брали от 5 до 10 особей, трижды промывали в стерильном физиологическом растворе, погружали на 3–5 мин в 96% спирт и снова трижды промывали физиологическим раствором. Клещей индивидуально гомогенизировали в 0.5 мл физраствора с последующим высевом на мясо-пептонный агар (МПА). Стерильность чашек после суточной инкубации при 37°C свидетельствовала об отсутствии бактерий у клещей.

После разделения клещей на группы им микроинъектором в полость тела вводили выше указанные культуры с учетом окончательной

микробной нагрузки  $1 \times 10^8$  бактерий на каждую особь. Длительность нахождения в клещах микроорганизмов контролировали путем высева гомогенатов клещей через 1, 3, 7, 14, 21, 28 суток после начала эксперимента. В указанные сроки вышеописанным методом получали индивидуальный клещевой гомогенат, 10-кратно разводили его и высевали 0.1 мл каждого разведения на агаровые пластинки, используя МПА или среду Эндо при работе с гомогенатами биинфицированных клещей. После суточной инкубации посевов при  $37^\circ\text{C}$  учитывали количество выросших колоний.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты показали, что половозрелые голодные клещи *Hyalomma asiaticum* могут быть резервуаром для вирулентных штаммов *S.typhimurium* 415 и *S.flexneri* 2a 51, сохраняя бактерии в течение 4 недельного срока наблюдений. Инфицированные в полость тела голодные клещи способны сохранять также и условно-патогенные бактерии *Kl.pneumoniae* K<sub>13</sub> №1470 и бактерии штамма *E.coli* O<sub>140</sub> №3/90, представителя нормальной микрофлоры кишечника человека.

Как видно из табл.1 представители указанных 4 видов энтеробактерий находились в организме клещей в течение 28 дней наблюдения на уровне, приблизительно равном первоначальной микробной нагрузке паразитов —  $1 \times 10^8$  микробов на каждую особь. Некоторое исключение составили вирулентные культуры. Так, штамм *S.flexneri* 2a 516 в первые 2 недели эксперимента высевался из клещевого гомогената в убывающем количестве от  $9 \times 10^7$  КОЕ/мл на 1 день опыта до  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл на 14 день.

В 2 последующие недели количество возбудителя определялось в высеваемом материале на уровне  $4 \times 10^6$  —  $4 \times 10^7$  КОЕ/мл. Штамм зоонозной инфекции (*S.typhimurium*) вел себя несколько иначе: к концу первой недели его высеваемость по сравнению с первоначальной микробной нагрузкой была максимальной ( $8 \times 10^7$  КОЕ/мл и  $1.7 \times 10^9$  КОЕ/мл соответственно), в последующем иерсистенция возбудителя оставалась стабильной на уровне  $10^8$  микробных клеток на каждый мл гомогената клеща.

Незначительность колебаний персистенции вирулентных штаммов в данном случае не дает оснований для каких-либо выводов об их отличающейся приспособляемости к существованию в гемолимфе, т.е. в системе *in vivo*.

В табл.2 показана динамика выживания штамма *E.coli* O<sub>140</sub> 3/90 и культуры *S.typhimurium* №415 в организме голодных клещей при совместной аппликации этих бактерий. Обращает на себя внимание тот факт, что в течение 4-х недельного одновременного пребывания бактерий в полости тела клеща соотношение уровней их популяции оставалось прежним и было приближено к первоначальному. Обедненная питательными веществами внутренняя среда голодного клеща, способная резервировать эти виды бактерий, является, как нам кажется удобным модельным объектом для выявления антагонистических отношений между вводимыми микробами в системе *in vivo*.

Обнаружение антагонистического эффекта у используемого штамма труднее объяснить пищевой конкуренцией бактерий, как это делается при вытеснении штамма *S.typhimurium* штаммом *E.coli* на изоляторных мышах, биассоциированных этими микроорганизмами [Ма-

Таблица 1.  
Динамика количества бактерий в организме клещей в условиях моноинфекции  
Table 1.  
Dynamics of a number of bacteria in the organism of tick in the conditions of monoinfection

Бактерии	Количество жизнеспособных микробных клеток в 1 мл клещевого гомогената на день наблюдения					
	1	3	7	14	21	28
<i>Salmonellatyphimurium</i> № 415	$8 \cdot 10^7$	$4.5 \cdot 10^8$	$1.7 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$
<i>Shigella flexneri</i> 2a №516	$9 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^7$
<i>Klebsiellapneumoniae</i> K <sub>13</sub>	$1.4 \cdot 10^8$	$1.1 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$
<i>Escherichiacoli</i> O <sub>140</sub> №3/90	$3.6 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$

Таблица 2.  
Динамика выживаемости бактерий в организме клещей в условиях смешанной инфекции  
Table 2.  
Dynamics of bacterial survival in the organism of tick in the conditions of mixed-infection

Штаммы-инфекты в биоконтаминированных клещах	Количество жизнеспособных микробных клеток в 1 мл клещевого гомогената на день наблюдения					
	1	3	7	14	21	28
Лактозопозитивные колонии <i>Escherichia coli</i> O <sub>140</sub> №3/90	3.5.10 <sup>8</sup>	2.3.10 <sup>8</sup>	2.9.10 <sup>9</sup>	1.10 <sup>8</sup>	2.10 <sup>8</sup>	2.10 <sup>8</sup>
Лактозонегативные колонии <i>Salmonellatyphimurium</i> №415	2.3.10 <sup>8</sup>	1.5.10 <sup>8</sup>	2.5.10 <sup>9</sup>	1.10 <sup>8</sup>	1.10 <sup>8</sup>	2.10 <sup>8</sup>

son, Richadson, 1981]. При использовании голодных клещей в качестве модельного объекта, возможно, будет более наглядным выявление конкурентных межмикробных отношений, обусловленных синтезом низкомолекулярных биологически активных веществ — пептидных антибиотиков, лизоцима и т.д., что является целью наших дальнейших исследований.

### ВЫВОДЫ

1. Полость тела голодных взрослых клещей *Hyalomma asiaticum* способна сохранять в течение месяца возбудителей сальмонеллезной и шигеллезной инфекций, а также условно-патогенных бактерий *Kl.pneumoniae*.
2. Данный модельный объект является благоприятным и для авирулентного штамма *E.coli*, персистирующего в полости тела как изолированно, так и в смеси со

штаммом *S.typhimurium* в отношении 1:1.

3. Бинарное бактерионосительство у голодных клещей позволит выявить на этой модели антагонистические взаимоотношения культур в условиях резкого снижения иммунитета.

### ЛИТЕРАТУРА

- Алексеев А.Н., Кондрашова З.Н. 1985. Организм членистоногих как среда обитания возбудителей. УНЦ АН СССР, Свердловск. 180 с.
- Подборонов В.М., Подборонов А.М. 1993. Лизоцим и другие антибактериальные факторы паразитических членистоногих и их воздействие на патогенные микроорганизмы. М. 294 с.
- Mason T.G., Richadson G.A. 1981. A review *Escherichia coli* and the human gut: some ecological consideration // J.Appl. Bacteriology. №1. P.1—16.
- Podboronov V.M. 1991. Antibacterial protective mechanisms of ixodoid ticks // Modern Acarology. (P.Dusbabek, V.Bukva) Prague, Academia and SPB Acad. Publ. Vol.2. P.375—380.