

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГРЫЗУНОВ НА ЧУМУ В МЕЖЭПИЗОТИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ Баканурская Т.Л.¹, Семиотрочев В.Л.²

¹Баканурская Татьяна Леонидовна - кандидат биологических наук, пенсионер;

²Семиотрочев Владлен Леонидович - доктор медицинских наук, пенсионер,
г. Санкт-Петербург

Аннотация: выполненное бактериологическое исследование грызунов на чуму в межэпизоотическом периоде позволило установить ряд закономерностей: на энзоотичной по чуме территории возбудитель чумы сохраняется в почве поселений грызунов в форме спор; в засушливые годы заражение чумой грызунов и верблюдов происходит респираторным путем; во влажные годы, с повышением жизнедеятельности грызунов и переносчиков, возникает трансмиссивный путь передачи инфекции, формирующий свойства возбудителя чумы. Морфогенез клеток чумного микроба, происходящий под влиянием смены механизма передачи возбудителя чумы, обуславливает: патологоанатомические изменения в организме зараженных животных; вариабельность микробных клеток в отпечатках органов грызунов; формирование морфологии колоний на питательных средах.

Ключевые слова: межэпидемический период, эндемичные территории, микроб чумы, споры.

Результаты исследований по поиску возбудителя чумы в межэпизоотический период на энзоотичной по чуме территории.

По современным представлениям, основной единицей организации биологического вида является популяция — единство особей, главным условием поддержания жизнеспособности которого является его генетическая неоднородность [1, 2, 3, 4]. Факторы внешней среды (а для возбудителя болезней в это понятие входят также организмы его переносчика и носителя) могут стать индуктором, активируя один ген (или группу генов) и (или) блокируя другой (другие), что резко меняет фенотипическое проявление признака [5, 6]. Популяция чумного микроба также находится под влиянием этих основных экологических факторов, в котором особое значение отражено в межэпизоотической фазе: в реальных взаимодействиях популяции происходят взаимoadaptации паразита и хозяина - «...морфогенез популяций микроба в рассматриваемый период логически закономерен и неизбежен» [7]. Однако глубина и форма изменчивости возбудителя чумы в межэпизоотический период полностью не раскрыта. Нами не было обнаружено работ по выявлению возбудителя чумы в межэпизоотический период и описания его свойств.

Целью нашей работы были поиски и изучение изолированных культур в межэпизоотический период на энзоотичной по чуме территории. Первые культуры нетипичных вариантов микроба чумы (они рассматриваются как микроб чумы на основании изучения подобных штаммов в лаборатории музея живых культур Среднеазиатского научно-исследовательского противочумного института в 80- начале 90-х г.г. прошлого века) были обнаружены в 1955-1958 годах при выполнении эпизоотологического обследования на чуму в противочумных отрядах в межэпизоотическом периоде на энзоотичной по чуме территории Волго-Уральских песков, где в предшествующие годы регистрировались интенсивно протекающие эпизоотии. Эти культуры были изолированы при посеве органов (легких, печени, селезенки и крови) полуденных песчанок: культуры не были чувствительны к специфическим чумным бактериофагам, у них отсутствовала вирулентность для белых мышей. Существенные отклонения отмечались в отношении морфологии клеток и формируемых ими колоний, а также в биохимической активности к различным сахарам. Подобные отклонения наблюдали в большинстве случаев и у штаммов, ранее полученных в этом районе [9]. В отпечатках органов полуденных песчанок на питательных средах формировались колонии, разнообразные по морфологии - от OS- до OR- форм. Наблюдали следующие типы колоний: мелкие, сероватого цвета, со слабо выраженной зернистостью и без периферической кружевной зоны; прозрачные, ахромогенные, слизистые, «кружевная» зона выражена слабо; темно-коричневые, с гладким вдавленным центром и валикообразно приподнятыми краями, без «кружевной» зоны; крупные, зернистые, плоские, темноокрашенные, антракоидного типа; мелкие, гладкие, темной окраски со слабой нежной полоской «кружевной» зоны. Отличались они и в биохимическом отношении - все описанные варианты вели себя не одинаково: часть из них ферментировала до кислоты глюкозу, мальтозу, не оказывая влияния на маннит, рамнозу, сахарозу и лактозу; отрицательные результаты были получены во всех случаях на глицерин, а также в реакции нитрификации и денитрификации. В мазках из таких колоний наблюдали клетки, которые находились в объединяющем их чехле в виде цепочки, реже регистрировали отдельно расположенные грубые клетки. В обоих случаях они окрашивались положительно по Граму. Их идентификация (на тот период) представляла большую трудность по ряду причин, основная из них - отсутствие разработанных для этой цели методик.

Позже, работая в межэпизоотический период в противочумных отрядах на территории Или-Каратальского природного очага чумы (1986 г.) и Центральных Кызылкумов (1989 г.), нам удалось, при помощи специально разработанных методик и способов исследования материала, обнаружить ряд культур и провести их идентификацию. В своей работе посев органов больших песчанок, отловленных в межэпизоотический период, производили на питательные среды, содержащие теллурид калия, а не генцианвиолет, в связи с тем, что по нашим наблюдениям, некоторые измененные формы микроба чумы были чувствительны к генцианвиолету. Внесение подобных изменений в методику посева материала грызунов и блох позволило получить две культуры, которые, имея типичные для этого возбудителя признаки, включая зависимость от ионов Са⁺ при 37°С и способность к пигментации, не вызывали гибели подопытных животных (белых мышей). Кроме того, из посева на указанных средах органов больших песчанок, отловленных на этой же территории, и их эктопаразитов было изолировано одиннадцать культур (0,2% от числа исследованных грызунов) - фагорезистентных, не ферментирующих углеводов, не продуцирующих капсульный антиген (фракцию 1) и пестицины. Они также не имели плазмид, которые соответствовали микробам чумы, ранее изолируемым на этой территории. Выделенные культуры формировали на питательных средах крупные шероховатые колонии с грубой периферической зоной, реже колонии имели характер колоний, описанных выше, но все они давали положительную реакцию с чумным ко-диагностиком [10, 11]. При заражении белых мышей и морских свинок полученными культурами отмечали их гибель в поздние сроки (белые мыши погибали на 15-18 день, морские свинки - на 20-25 день). На вскрытии у подопытных животных отмечали дряблую, темную печень и такую же селезенку, в мазках-отпечатках грубые палочки, положительно окрашивающиеся по Граму. Исходные культуры в мазках по Граму окрашивались положительно и имели вид длинных нитей, состоящих из грубых палочек в объединяющем их чехле, иногда они были фрагментированы на отдельные крупные микробные клетки. Путем многократных посевов на питательных средах, содержащих углеводы и генцианвиолет, из указанных культур удалось получить 9 субкультур с манифестными признаками возбудителя чумы. Они формировали различного типа колонии с характерной для возбудителя чумы зоной, имели разную степень чувствительности к чумным диагностическим фагам и отклонения в ферментативной активности по отношению к углеводам. Четыре из них, имевшие гладкие типы колоний, были устойчивы к чумным диагностическим фагам Покровской, Л-413 и псевдотуберкулезному фагу, не ферментировали галактозу. Другие, чувствительные к псевдотуберкулезному фагу, ферментировали галактозу в поздние сроки. Мальтозу разлагали без газа все субкультуры. Ни одна из полученных субкультур не ферментировала глицерин. Субкультуры не имели капсульного антигена, формировали единичные колонии на оксалатно-магниевой среде Хигучи-Смита при 28°С, были неспособны сорбировать гемин на среде Джексона-Берроуза, не продуцировали пестицин, не имели плазмид. В мазках, приготовленных из субкультур, отмечали длинные цепочки из грамтрицательных биполярно окрашенных клеток. При пассировании фагорезистентных штаммов на белых мышках были получены две субкультуры, чувствительные к чумным диагностическим фагам. Они имели типичную морфологию колоний для микроба чумы, продуцировали пестицин 1, содержание которого снижалось при пяти-шестикратных посевах на искусственных питательных средах. На средах с геминном одна из полученных субкультур формировала 100%, а другие 52% непигментированных колоний. Они были зависимы от ионов кальция при 37°С и вызывали гибель белых мышей и морских свинок при введении последним под кожу взвеси, содержащей 100 м.к. Первая субкультура была глицериннегативной, вторая ферментировала его в поздние сроки (на 4-5 сутки). Кроме того, субкультуры, полученные из органов зараженных белых мышей и морских свинок, имели плазмиды 61,45 и 6 Mdal, характерные для возбудителя чумы.

В музее живых культур института при ряде последовательных посевов на питательных средах коллекционных штаммов возбудителя чумы, длительное время сохранявшихся в лиофилизированном состоянии и на искусственных питательных средах, среди типичных колоний микроба чумы наблюдали колонии, напоминавшие антракоидные, и плоские прозрачные с мутным центром колонии микроба чумы. В мазках, приготовленных из указанных, не типичных для микроба чумы колоний, отмечали длинные грамположительные нити - цепочки грамтрицательных клеток, заключенные в общий чехол. При их поэтапном пересеве на питательных средах, происходила их фрагментация на крупные грамположительные палочки. Указанные клетки не отличались от тех, которые мы регистрировали на энзоотичной по чуме территории в межэпизоотический период. У грамположительных клеток, выделенных из наблюдаемых нами культур, при последовательных посевах на питательных средах с генцианвиолетом отмечали потерю ими окутывающего клетки чехла и появление большого числа грамтрицательных овоидных, имеющих биполярную окраску клеток. Морфогенез клеток отражался и на морфологии их колоний на питательных средах. В колониях антракоидного типа наблюдали нитевидные образования микробных клеток в объединяющем их чехле. Микробные клетки в виде грубых грамположительных палочек формировали грубые колонии, напоминающие колонии R-типа возбудителя чумы, некоторые из них, через ряд промежуточных OS- и OR-форм, после многократных

пересевов формировали типичные для микроба чумы колонии, состоящие из биполярно окрашенных клеток. Субкультуры, полученные из последнего типа колоний, имели типичные для возбудителя чумы свойства, в то время как предшествующие, описанные выше колонии, имели отклонения от типичных свойств по ряду признаков. Они отличались по чувствительности к чумным диагностическим фагам, ферментационной активности по отношению к сахарам, содержанию фракции 1 и др. Однако все они давали положительную реакцию с ко-диагностиком. При длительном хранении на питательных средах (без последующих пересевов) субкультур нитеобразных образований клеток в объединяющем их чехле, окрашивающихся по Граму положительно, они распадались, образуя овальные образования, которые воспринимали окраску фуксином, что позволило считать их спорами. Они были высоко устойчивы к неблагоприятным условиям содержания на питательных средах - сохраняли жизнеспособность при их высушивании, не погибали при кипячении в течение 2-3 минут, вегетировали после воздействия на них парами хлороформа, но не росли на средах, содержащих генцианвиолет. Споры легко обнаруживали при окраске фуксином исследуемого материала, нанесенного на предметные стекла. Белые мыши, зараженные подкожно или интраназально культурами из нитеобразных клеток, не погибали, но у забитых на 14-16 суток белых мышей в отпечатках их печени и селезенки регистрировали исходные клетки, окрашивающиеся положительно по Граму. При пассировании материала забитых белых мышей на экспериментальных животных отмечали гибель последних на 6-8 пассаже с выделением типичных клеток микроба чумы.

Заключение

По данным ряда исследователей, в природных очагах чумы нередко находят варианты возбудителя чумы с различными отклонениями: по морфологии колоний, ферментативной активности, содержанию фракции 1, резистентные к чумным диагностическим фагам и т.д., что указывает на изменения, происходящие в популяции микроба чумы в процессе существующей динамики его развития в природных условиях. Присутствие в популяциях грызунов особей, чувствительных к заражению микробом чумы, приводит, при их гибели и обсеменению микробами чумы окружающей среды, что подтверждается многочисленными случаями обнаружения возбудителя в почве [12]. Сучков Ю.Г. с соавт. [13] использовал ПЦР для обнаружения возбудителя чумы в почве. По данным его исследований положительные результаты получены у 4% проб отобранного материала из почв колоний большой песчанки. Однако ему не удалось обнаружить некультивируемые микробы чумы в почве, как он это себе представлял. Многочисленные публикации, свидетельствующие о находках возбудителя чумы в пробах почв поселений грызунов, послужили основанием для принятия гипотезы о «теллурической» чуме [14]. По результатам наших исследований, погибшие грызуны, в трупах которых произошла трансформация микробных клеток, разлагаясь, загрязняют спорами почву их поселений [15, 16]. В межэпизоотический период популяция грызунов данного поселения исчезает. При благоприятных условиях повышается численность грызунов, которые заселяют «мертвые» колонии, и происходит их заражение респираторным путем, то есть, при вдыхании грызунами спор возбудителя чумы вместе с пылью при рытье нор. В таких случаях нередко у первых выявленных павших зверьков регистрировали поражения легких, что свидетельствует о респираторном пути их заражения. Это подтверждают одновременность и массовость первичных заражений грызунов (в частности, суслика) после продолжительного межэпизоотического периода (50 лет) при рытье ими нор в местах прежних поселений, зараженных спорами возбудителя чумы [17, 18]. Последующее включение в этот процесс трансмиссивного пути передачи инфекции привело к развитию эпизоотий чумы на данной территории. Кроме того, в пользу этой точки зрения свидетельствует факт заражения верблюда в 1963 году в межэпизоотический период на территории Нукусского природного очага чумы [19] в Турткульском районе Каракалпакской АССР, где у павшего верблюда на вскрытии отмечен отек легких с множественными уплотнениями ткани в виде горошин, из этих уплотнений был изолирован возбудитель чумы. Как известно, верблюды на такырных участках природных очагов чумы выбирают для отдыха колонии больших песчанок, как наиболее мягкий участок территории. Лежа на колониях, они, для удаления с морды напавших насекомых, с силой выдыхают воздух, поднятая ими с колоний большой песчанки пыль при вдыхании попадает им в легкие. По-видимому, это является наиболее частым механизмом заражения верблюдов возбудителем чумы. Позже, в 1964 году, в колхозе «Правда», расположенном на такырной территории (Мангыстауский район Гурьевской области, Каз.ССР) умер чабан, имевший легочную форму чумы. Он мог заразиться только от верблюда, больного легочной формой чумы, иного пути заражения легочной формой у чабана не существовало. В этом районе в этот же период отмечен падеж верблюдов, и в ряде случаев установлено заболевание людей бубонной формой чумы при прирезке больных верблюдов.

Выводы.

На энзоотичной по чуме территории свойства микроба чумы изменяются в зависимости от механизма передачи инфекции:

- в засушливые годы, неблагоприятные для жизнедеятельности грызунов и эктопаразитов, существует респираторный путь заражения грызунов. В этот период при их исследовании на чуму не обнаруживают

характерные для чумы патологоанатомические изменения в их органах, в отпечатках органов регистрируют крупные палочки микроба, иногда они объединены общим чехлом в виде длинных нитей. Эти клетки формируют нетипичные для микроба чумы колонии на питательных средах. Полученные из них культуры вызывают гибель белых мышей и морских свинок в поздние сроки (на 15-25 день). Установлено, что указанные выше клетки с измененной морфологией образуют споры, выявляемые при окраске фуксином материала при нанесении его на предметное стекло. Споры способны длительный период сохраняться в почве колоний грызунов. Существование респираторного пути заражения грызунов подтверждают случаи заболевания верблюдов легочной формой чумы на такырных участках природных очагов чумы.

- во влажные периоды года, благоприятные для активной жизнедеятельности грызунов, перемещения молодняка и т.д., на фоне увеличения численности эктопаразитов, осуществляется трансмиссивный путь передачи инфекции, формирующий типичные свойства для возбудителя чумы. Он вызывает характерные для чумы патологоанатомические изменения в органах грызунов, в которых обнаруживают типичные для микроба чумы клетки, формирующие на питательных средах типичные для микроба чумы колонии.

Совпадение или несовпадение динамик развития популяции грызунов и паразитирующих на них эктопаразитов, с учетом изменения климатических условий, обуславливают характер проявления эпизоотического процесса (рост, стабилизацию, снижение, интенсивность процесса развития популяции грызунов и возбудителя), т.е. определяет своеобразие эпизоотической тенденции.

Список литературы

1. Четвериков С.С. О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики // Журн. экспер. биол., 1926. Серии А. Т. 2. С. 3-11.
2. Шмальгаузен И.И. Интеграция биологических систем и их саморегуляция // Бюлл. МОИП, биол., 1961. Т. 66. № 2. С. 104-134.
3. Шмальгаузен И.И. Факторы эволюции. Теория стабилизирующего отбора // М., 1988. 451 с.
4. Тимофеев-Рессовский Н.В., Воронцов Н.Н., Яблоков А.В. Краткий очерк теории эволюции // М., 1969. 407 с.
5. Медиков Б.М. Дарвин в XX веке // М., 1975. 223 с.
6. Рокицкий П. Принципиальные вопросы современной генетики // Коммунист, 1978. № 9. С. 69-80.
7. Коренберг Э.И. Современная популяционная экология и учение о природной очаговости болезней // Мед. паразитол. и паразитарные болезни, 1981. № 3. С. 3-11.
8. Лавровский А.А., Попов Н.В. Межэпидемический период очага чумы как одна из фаз саморазвития экосистемы природного очага чумы. // Пробл. особо опасн. инфекций. Саратов, 1987. № 2. С. 5-9.
9. Домарадский И.В. Чума. Москва, 1998.
10. Баканурская Т.Л., Степанов В.М., Семиотрочев В.Л. и др. Штамм возбудителя чумы, используемый для получения антител к гладкому варианту микроба чумы. Авторское свидетельство № 1400065 от 18.12.1986.
11. Методические рекомендации по изготовлению и применению иммуноглобулинового чумного ко-диагностикума для индикации возбудителя чумы. Баканурская Т.Л., Степанов В.М., Шамардин В.А., Семиотрочев В.Л., Рудь Н.В., Сатыбалдиев Н.А. // Алма-Ата, 1988. 5 стр.
12. Тимофеева Л.А., Головачева В.Л., Смирнова Л.А. Сохранение микроба чумы в почве, взятой из нор грызунов // Особо опасные инфекции в Сибири и на Дальнем Востоке. Кызыл, 1966. С. 9-17.
13. Сучков Ю.Г., Худяков И.В., Емельяненко Е.Н. и др. О возможности сохранения возбудителя чумы в почве в покоящейся (некультивируемой) форме // Журнал. Микробиол, 1997. № 4. С. 42-46.
14. Сунцов В.В., Сунцова Н.И. Чума. Происхождение и эволюция эпизоотической системы (экология, географические и социальные аспекты) Москва. Изд. КМК, 2006. 247 с.
15. Баканурская Т.Л., Семиотрочев В.Л. Спорообразование у возбудителя чумы. Проб. сан. эпидохраны стран СНГ. Саратов, 1998. С. 128-129.
16. Баканурская Т.Л., Огарков П.И., Семиотрочев В.Л. Спорообразование у возбудителя чумы. // Вирусные инфекции на пороге XXI века. Эпидемиология и профилактика. 21-22 апреля 1990, С.190.
17. Шевченко В.Л., Шевченко Г.В., Сурков В.В. Эпизоотия чумы в северо-восточной части Волго-Уральских песков 1977-1978 // Эпизоотология природно-очаговых инфекций. Саратов, 1985. С. 19-22.
18. Шевченко В.Л., Шевченко Г.В., Гражданов А.К. и др. Общий характер эпизоотий чумы в Волго-Уральском и Зауральском степных очагов. Современ. аспекты эпиднадзора за особо опас. инф. Алма-Ата, 1990. С. 51.
19. Найден П.Е., Дятлов А.И. Эпизоотологические особенности пустыни Кызылжум // Проблемы особо опасных инфекций, 1968. № 4. С. 74-78.