

УДК 574.4-57:51-76

**РАЗВИТИЕ ПОПУЛЯЦИИ *IXODES PERSULCATUS* SCHULZE, 1930
(ACARINA, IXODOIDEA) В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОГО
ЭКСПЕРИМЕНТА**

© Г. А. Данчинова,^{1*} Н. В. Яковчиц,¹ А. В. Ляпунов,¹
Н. В. Кулакова,² Е. В. Дубинина,³ М. А. Хаснатинов¹

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека
ул. Тимирязева, 16, Иркутск, 664003

² Лимнологический институт СО РАН
ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033

³ Зоологический институт РАН
Университетская наб., 1, С.-Петербург, 199034

* E-mail: dan-chin@yandex.ru

Поступила 06.10.2017

В условиях лабораторного эксперимента показаны стадии развития популяции таежного клеща *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930, являющегося основным переносчиком опасных инфекционных заболеваний и обитающего практически на всей территории России и сопредельных стран. Клещи собраны с растительности в Иркутской обл. и содержались при 23—25 °С, относительной влажности 80—90 % и фотопериодичности свет/темнота, равной 16/8 ч. Среднее время инкубации яиц составило 35.2 дней, питание самок, личинок и нимф занимало 6.4, 3.5 и 4.5 дня соответственно. Экспериментально показано формирование двух различных популяций таежных клещей — с длительным и коротким сроком развития и линьки напитавшихся личинок в нимф и нимф в имаго. Большинство клещей имели короткий период развития личинок и нимф продолжительностью 25 ± 2 и 40 ± 4 дня соответственно. Однако часть клещей отличалась длительным периодом метаморфоза личинок и нимф в 75.5 ± 2 и 95 ± 9 дней соответственно. Суммарная продолжительность жизненного цикла составила 121 день в группе с коротким периодом развития и 226 дней в группе с длинным периодом развития.

Ключевые слова: *Ixodes persulcatus*, жизненный цикл, лабораторная колония, ITS2.

Иксодовые клещи служат хозяевами и переносчиками целого ряда заболеваний вирусной, бактериальной и протозойной природы (Балашов, 1998; Данчинова и др., 2006; Shrynov et al., 2006). В настоящее время используются эффективные инструменты изучения некоторых видов иксодовых клещей и переносимых ими патогенных микроорганизмов с помощью лабораторных колоний этих членистоногих. Были получены новые данные о биологии и взаимодействии с микроорганизмами таких клещей, как *I. ricinus* L., 1758 (Labuda et al., 1996; Richter et al., 2002), *I. scapularis*

Say, 1821 (Baldrige et al., 2007), *I. pacificus* Cooley и Kohls, 1943 (Troughton, Levin, 2007). Было установлено, что контролируемые условия содержания, обеспечивающие влажность >80 %, температуру 22—24 °С и продолжительность периодов света и темноты, равную 16 и 8 ч соответственно, позволяют поддерживать устойчивые колонии многих видов иксодовых клещей с достаточно коротким для эффективной экспериментальной работы циклом жизни 161—168 дней (Troughton, Levin, 2007).

Таежный клещ и передаваемые им патогены в экспериментальном плане изучены гораздо слабее. Одним из затруднений при поддержании лабораторных линий *I. persulcatus* и проведении лабораторных экспериментов с ними является длительный и неравномерный жизненный цикл этих клещей. В природных условиях полный жизненный цикл таежного клеща может достигать 4—5 лет и более (Шихарбеев, 1965), а в лабораторных условиях минимальный жизненный цикл таежных клещей составляет около 250 дней (Konnai et al., 2008). Однако в приведенных работах условия лабораторного содержания характеризовались коротким фотопериодом и более низкой температурой окружающей среды: соотношение света и темноты 12 : 12 ч или 8 : 16 ч при температуре 18—20 °С (Шихарбеев, 1965; Konnai et al., 2008).

Цель данной работы — выяснить особенности содержания таежных клещей и установить динамику развития клещей на преимагинальных стадиях в лабораторных условиях, обеспечивающих наиболее короткий цикл репродукции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Двенадцать пар самок и самцов *I. persulcatus* отловлены в природных очагах «клещевых» инфекций в Иркутской обл. Вид клещей идентифицирован по определителям иксодовых клещей (Сердюкова, 1956; Филиппова, 1977). Видовая принадлежность подтверждена с помощью филогенетического анализа транскрибируемого рибосомального спейсера (ITS2). ДНК выделяли с помощью набора «ДНК-сорб-В» (Амплисенс, Москва). Полноразмерный спейсер ITS2 амплифицировали согласно M. Fukunaga et al. (2000). Первичную нуклеотидную последовательность фрагментов устанавливали с помощью анализатора Beckman Coulter Genetic Sequencing System 1800 (США) и соответствующих наборов реагентов. Редактирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit 5.0.9. Расчеты проводили с помощью программы MEGA 4. Эволюционные дистанции рассчитаны по модели Tamura-Nei, 1993. Бутстреп-анализ на основе 1000 псевдовыборок.

Формирование и содержание лабораторной колонии *I. persulcatus*

Голодных самок таежных клещей вместе с самцами содержали в эксикаторе с насыщенным раствором MgSO₄ на дне. Самок, личинок и нимф таежных клещей прокармливали на беспородных белых мышах. Оплодотворенных самок после прокармливания группировали в 6 линий по 1—4

Характеристика колонии клещей
Characterization of tick colony

Номер выборки	Дата отлова самок	Сроки прокормления личинок
N1.1—N1.5	26.05.2009	17.07.2009—20.07.2009
N2.1—N2.8	02.06.2009	24.07.2009—27.07.2009
N3.1—N3.8	22.06.2009	11.08.2009—14.08.2009
N4.1—N4.8	12.05.2010	07.07.2010—23.07.2010
N5.1—N5.5	31.05.2010	20.08.2010—25.08.2010
N6.1—N6.4	04.07.2010	30.08.2010—06.09.2010

особи. Самки одной линии были отловлены в одном биоценозе в одно и то же время. Впоследствии и самки, и их потомство прокармливались в одинаковые сроки. После вылупления личинок внутри каждой линии формировали 5—8 выборок, каждая объемом в 50 особей, которые в дальнейшем исследовали независимо друг от друга (см. таблицу).

Каждую выборку личинок и нимф содержали в отдельном (7 мл) стеклянном вентилируемом флаконе, помещенном в эксикатор с насыщенным раствором MgSO₄ на дне. Все линии колонии поддерживали в идентичных условиях в изолированном от внешней среды боксе в режиме «длинного дня» (16 ч светлого времени, 8 ч темноты) при постоянной температуре 23—25 °С и относительной влажности >80 %.

Статистическая обработка данных

Для оценки вариабельности результатов рассчитывали стандартное отклонение средних значений; при сравнении продолжительности развития личинок определяли 95 % доверительный интервал (рис. 3). Для оценки нормальности распределения использовали тест Колмогорова—Смирнова, для оценки достоверности различий между выборками и линиями клещей применяли дисперсионный анализ Краскела—Уоллеса и медианный анализ. Расчеты проводили с использованием пакета программ Statistica 6.1 (StatSoft Inc., 1984—2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Родительские самки и их потомство идентифицированы как вид *I. persulcatus* на основании морфологических признаков. Поскольку состав видов клещей постоянно дополняется и изменяется исследователями, в том числе и в изучаемом регионе (Khasnatinov et al., 2016), то для подтверждения определения вида была расшифрована, проанализирована и депонирована в GenBank под номером JF501021 первичная нуклеотидная последовательность транскрибируемого межгенного спейсера ITS2 нимфы «Ip20n-IRK2009» из выборки 2.1 (см. таблицу). Отличительной особенностью этого фрагмента генома является высокая степень межвидовой гетерогенности, поэтому данный фрагмент позволяет достоверно идентифицировать вид клеща и широко используется при изучении эволюции ик-

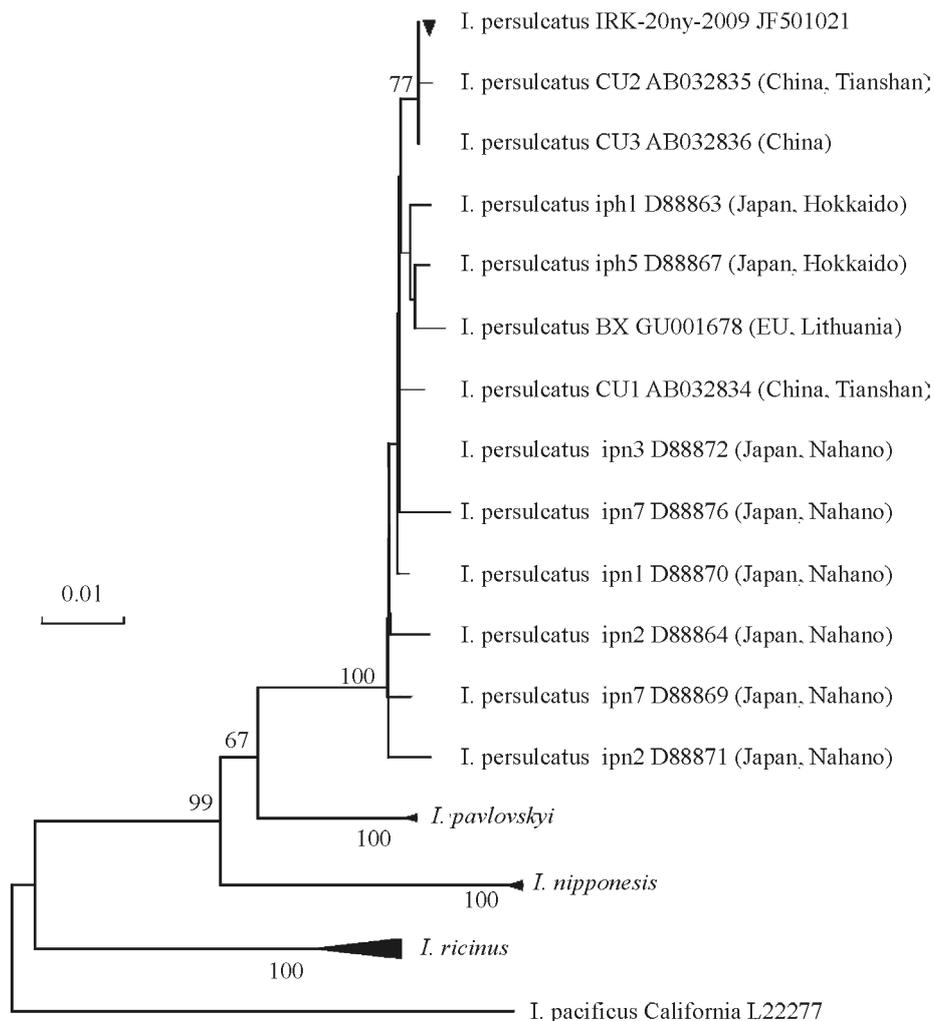


Рис. 1. Филогенетические взаимосвязи таежных клещей Прибайкалья, реконструированные на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента (711 н. о.) рибосомального спейсера ITS2. Филогенетический анализ последовательностей проводили на основе анализа фрагмента спейсера ITS2 длиной 711 нуклеотидных оснований (н. о.). Последовательность иркутской популяции IRK-20ny-2009 обозначена черным треугольником. Neighbor-Joining.

Fig. 1. Phylogenetic relationships of *Ixodes* spp. ticks based on the nucleotide sequence of 711 bp fragment of the internal transcribed spacer 2 (ITS2). Sequence IRK-20ny-2009 established in this work and designated by inverted black triangle. Neighbor-Joining.

содовых клещей (Fukunaga et al., 2000). Длина спейсера без учета последовательностей генов 5.8S и 28S рРНК составила 718 н. о., что соответствует длине ITS2 в других популяциях *I. persulcatus* (715—722 н. о.) (Fukunaga et al., 2000). Филогенетический анализ этой последовательности показал, что клещ с высокой степенью вероятности (бутстреп-поддержка 100 %) принадлежит к виду *I. persulcatus* и формирует одну кладу с популяциями таежных клещей, обитающими в китайской части Тянь-Шаня (рис. 1). Большинство стадий жизненного цикла лабораторной колонии проходило

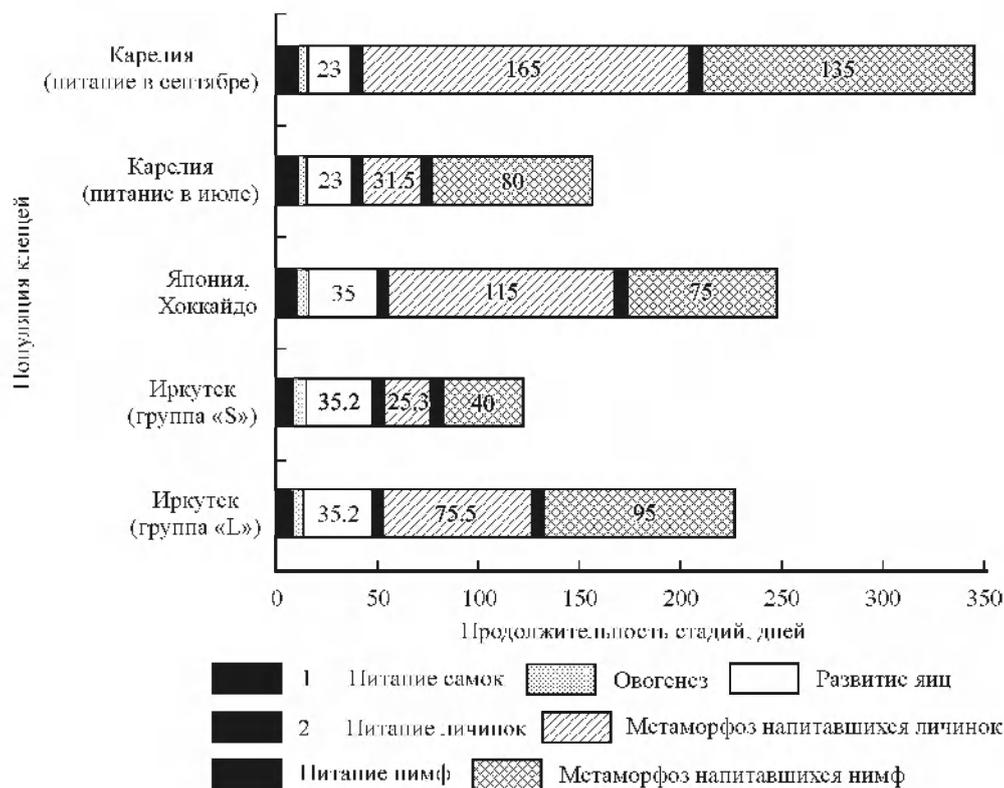


Рис. 2. Продолжительность жизненного цикла *I. persulcatus* в разных частях ареала. Цифры внутри блоков обозначают продолжительность соответствующего этапа жизненного цикла в днях. Данные: по Карелии (Хейсин, 1955), по Японии (Konnai et al., 2008).

Fig. 2. Duration of life cycle of *I. persulcatus* in different parts of the distribution range.

в сроки, сопоставимые с западными и восточными популяциями *I. persulcatus* (рис. 2). Продолжительность питания самок составила в среднем 6.4 ± 1.3 дня, овогенез занимал 6.2 ± 3 дня, развитие яиц продолжалось 35.2 ± 2.5 дня. Личинки питались на беспородных белых мышах в течение 3.5 ± 0.4 , а нимфы — 4.5 ± 0.5 дней.

Однако сроки метаморфоза личинок в нимф и нимф в имаго отличались как от описанных ранее, так и между различными выборками клещей. Клещи в колонии разделились на 2 группы — с длинной (рис. 2, группа «L») и с короткой (рис. 2, группа «S») продолжительностью метаморфоза преимагинальных стадий. В группу «L» вошли клещи из выборок N5.1—N5.5, а также часть клещей из выборок N6.2 и N6.3. Скорость метаморфоза у этих клещей достоверно отличалась от группы «S» удлинённым периодом метаморфоза личинок в нимф, продолжавшимся в среднем 76.9 ± 10.4 дней ($P < 0.0001$, тест Краскела—Уоллеса, медианный анализ). Период метаморфоза нимф в имаго у клещей этой группы также был увеличен и составил 95.0 ± 9.0 дней. Группа клещей «S» состояла из клещей выборок N4.1—N4.8, N6.2, N6.4, а также части клещей из выборок N6.2 и N6.3. Для преимагинальных стадий этой группы клещей был характерен более чем в два раза укороченный период метаморфоза. Так, вылупление нимф из ли-

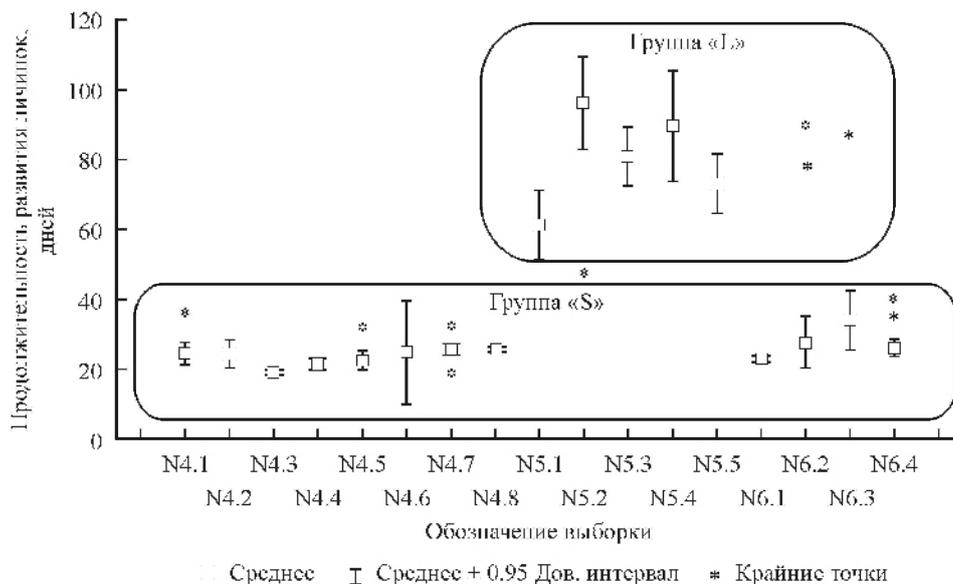


Рис. 3. Развитие напивавшихся личинок *I. persulcatus* в нимф в лабораторных условиях. N 4.1—N 6.4 — средние значения продолжительности метаморфоза для выборок личинок в соответствии с таблицей. Крайние точки (*) обозначают особей внутри выборки, срок развития которых выходил за пределы 95 % доверительного интервала. Результаты теста Краскела—Уоллеса указывают на достоверность наблюдаемых различий между группами (KW-H (16; 236) = 139.18; p = 0.00001).

Fig. 3. Development time of engorged larvae under standardized conditions.

чинок наступило через 27.5 ± 4.5 дня, а имаго из нимф — через 40 ± 4 дня. При этом, как уже было указано выше, внутри выборок N6.2 и N6.3 отдельные особи достоверно отличались по продолжительности развития напивавшихся личинок от большинства этой линии ($P < 0.0001$, тест Краскела—Уоллеса) и входили в группу «L» (рис. 3).

Анализируя опубликованные данные по динамике развития таежных клещей в разных частях ареала (рис. 2), можно отметить, что по сравнению с клещами из европейской части ареала — Карелии (Хейсин, 1955; Хейсин и др., 1955; Филиппова, 1985) — отмечается некоторое уменьшение продолжительности питания самок (6.4 ± 1.36 дней против 9) и удлинение периода развития личинок из яиц (35.2 ± 2.48 дней против 23). Также присутствует разделение этапа метаморфоза личинок на длинно- и короткопериодические варианты развития. Согласно литературным данным, продолжительность развития личинок таежного клеща в природных условиях колеблется от 22 в Хабаровском крае до 123 сут в Латвии. Установлено, что основным фактором, определяющим продолжительность развития личинок, является сезон питания личинок (Филиппова, 1985). Так, в исследованиях Е. М. Хейсина (1955) показано, что продолжительность развития личинок, питавшихся в июне и июле, составляла 28—35 дней, тогда как личинки, питавшиеся в сентябре, развивались в нимф в течение 150—180 дней. Однако подобное объяснение этого факта неприменимо к нашему эксперименту, так как все клещи были отловлены и прокормлены в сопоставимое время года (см. таблицу), а сама лабораторная колония содержалась в стандартизованных искусственных условиях с заданной темпе-

ратурой, влажностью, режимом и интенсивностью освещения. Кроме того, если в случае с выборками N5.1—N5.5 длинный период развития может быть пояснен отличиями от других линий сроками отлова родительской самки, продолжительностью «голодного» периода личинок и сроками их прокормления (конец августа), то клещи в выборках N6.1—N6.4 по этим показателям не отличались друг от друга. Все личинки этой линии были получены от 4 пар голодных клещей, отловленных в один и тот же день в пределах одного биотопа (см. таблицу).

Возможны два объяснения наблюдаемого явления. Во-первых, можно предположить, что скорость метаморфоза регулируется на генетическом уровне и существует две внутривидовые группы таежных клещей — длиннопериодичная, характеризующаяся долгим метаморфозом и повышенной склонностью к входу в диапаузу, и короткопериодичная, возможно, характеризующаяся короткими сроками метаморфоза и бездиапаузным циклом жизни. При развитии данного сценария формируются два независимых способа существования и развития этого вида в природе, которые дополняют друг друга и гарантируют повышенную выживаемость клещей в нестабильных, особенно резко континентальных климатических условиях. Во-вторых, продолжительность метаморфоза может регулироваться на организменном уровне определенными физиологическими параметрами личинки, например, продолжительностью периода между вылуплением из яйца и началом питания или степенью напитанности личинки. Эти параметры не отслеживались в ходе нашей работы, поэтому не исключено, что личинки в выборках N6.2 и N6.3 были неоднородны по этим показателям. В данном случае также предполагается два способа существования вида в природе, хотя генетического разделения по продолжительности жизненного цикла нет, а вид генетически однороден и скорость развития на каждой стадии жизни определяется для конкретной особи случайным образом.

При сравнении с клещами из восточной части ареала (Япония, о-в Хоккайдо) отмечены практически идентичные сроки питания самок, развития личинок из яиц и питания личинок и нимф (Konnai et al., 2008). Существенные различия были выявлены только на этапе метаморфоза личинок в нимф. У японских клещей не наблюдалось расщепления на длинно- и короткопериодичные популяции. Кроме того, срок метаморфоза личинок в нимф у наших клещей в лабораторном эксперименте был существенно короче, чем у японских, даже для длиннопериодичной группы — 75.5 дней против 115.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В лабораторных условиях с заданными климатическими характеристиками было установлено, что суммарная продолжительность жизненного цикла составила 121 день в группе с коротким периодом развития и 226 дней в группе с длинным периодом развития. В нашем эксперименте метаморфоз личинок был самым коротким среди ранее проанализированных популяций. Можно предположить, что наблюдаемые отличия вызваны внесенными нами изменениями в условия содержания колонии. В нашем исследовании был применен режим «длинного» дня (16 ч) и постоян-

ная температура 22—25 °С, тогда как в работе Konnai (2008) использован режим 12 ч и температура +20 °С, а в работе Е. М. Хейсина (1955) использовалась температура 17—23 °С и не контролировались условия освещения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность О. В. Лисак и В. В. Балыбиной (ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека») за техническую помощь.

Исследование проведено с использованием оборудования Центра коллективного пользования «ПЦР-диагностика» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ.

Список литературы

- Балашов Ю. С. 1998. Иксодовые клещи — паразиты и переносчики инфекций. Л.: Наука. 287 с.
- Данчинова Г. А., Хаснатинов М. А., Злобин В. И. и др. 2006. Иксодовые клещи юга Восточной Сибири и Монголии и их спонтанная зараженность возбудителями природно-очаговых трансмиссивных инфекций. Бюллетень сибирской медицины. 5 (1): 137—143.
- Сердюкова Г. В. 1956. Иксодовые клещи фауны СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР. 122 с.
- Филиппова Н. А. (ред.). 1985. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae). Морфология, систематика, экология, медицинское значение. Л.: Наука. 416 с.
- Филиппова Н. А. 1977. Иксодовые клещи подсем. Ixodinae. В кн.: Фауна СССР. Паукообразные. Л.: Наука. IV (4). 396 с.
- Хейсин Е. М. 1955. Продолжительность развития личинок и нимф *I. ricinus* и *I. persulcatus* в разные сезоны года (к вопросу о диапаузе). Труды Карело-Финского государственного университета. 6: 28—44.
- Хейсин Е. М., Павловская О., Малахова Р. П., Рыбак В. Ф. 1955. Продолжительность цикла развития *Ixodes persulcatus* в природных условиях Карело-Финской ССР. Труды Карело-Финского государственного университета. 6: 102—123.
- Шихарбиев Б. В. 1965. О сроках линьки личинок и нимф у лесного клеща *Ixodes persulcatus* Sch. в очаге клещевого энцефалита на юго-западе Иркутской области. Труды Иркутского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии. 8: 253—261.
- Baldrige G. D., Kurtti T. J., Burkhardt N. et al. 2007. Infection of *Ixodes scapularis* ticks with *Rickettsia monacensis* expressing green fluorescent protein: A model system. Journal of Invertebrate Pathology. 94 (3): 163—174.
- Fukunaga M., Yabuki M., Hamase A. et al. 2000. Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. Journal of Parasitology. 86 (1): 38—43.
- Khasnatinov M. A., Liapunov A. V., Manzarova E. L., Petrova I. V., Kulakova N. V., Danchinova G. A. 2016. The diversity and prevalence of hard ticks attacking human hosts in Eastern Siberia (Russian Federation) with first description of invasion of non-endemic tick species. Parasitology Research. 115 (2): 501—510.
- Konnai S., Saito Y., Nishikado H. S. et al. 2008. Establishment of a laboratory colony of taiga tick *Ixodes persulcatus* for tick-borne pathogen transmission studies. Japanese Journal of Veterinary Research. 55 (2—3): 85—92.
- Labuda M., Austyn J. M., Zuffova E. et al. 1996. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. Virology. 219 (2): 357—366.

- Richter D., Allgower R., Matuschka F.-R. 2002. Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerging Infectious Diseases*. 8 (12):1421—1425.
- Shpynov S., Fournier P. E., Rudakov N. et al. 2006. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1078: 378—383.
- Troughton D., Levin M. L. 2007. Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*. 44 (5): 732—740.

DEVELOPMENT OF THE TAIGA TICK *IXODES PERSULCATUS* SCHULZE, 1930
POPULATION UNDER LABORATORY CONDITIONS

G. A. Danchinova, N. V. Yakovchits, A. V. Liapunov, N. V. Kulakova,
E. V. Dubinina, M. A. Khasnatinov

Key words: *Ixodes persulcatus*, development, life cycle, laboratory colony, ITS2, Russia, East Siberia.

SUMMARY

The dynamics of development of the population of taiga ticks *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930 inhabiting Eastern Siberia is shown in the experimental conditions.

Ticks were reared at 23—25 °C, relative humidity of 80—90 % and light/darkness ratio of 16/8 hours. The average time of egg incubation comprised 35.2 days, the feeding of females, larvae and nymphs took 6.4, 3.5 and 4.5 days respectively. It was shown experimentally that there are two subpopulations of taiga ticks — with long and short time of development of fed larvae into the nymphs and nymphs into the imago. The majority of ticks exhibited short period of development of larvae and nymphs that lasted for 25 ± 2 and 40 ± 4 days respectively. However, part of ticks exhibited prolonged development time of 75.5 ± 2 and 95 ± 9 days, respectively. The total duration of life cycle comprised 121 days in the short development time group and 226 days in the group with prolonged development time.