

УДК 576.895.42 + 579.83.114

ЛОКАЛИЗАЦИЯ БОРРЕЛИЙ В ОРГАНИЗМЕ КЛЕЩА
IXODES PERSULCATUS НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ

© Ю. С. Балашов, Л. А. Григорьева, Дж. Х. Оливер

Borrelia burgdorferi s. lato обнаружены в темном поле, в фазовом и аноптальном контрастах у 87.4 % имаго и 100 % нимф и личинок *I. persulcatus*, собранных в Ленинградской, Новгородской и Псковской обл. Среди боррелий различаются 4 морфологических типа, присутствующие на всех стадиях развития клещей. Локализация возбудителя в клещах выявлена на материале, серебреном по Левадиги. У голодных особей основная масса возбудителя сосредоточена на апикальной поверхности эпителия средней кишки. У значительной части голодных *I. persulcatus* отмечена генерализованная инфекция. Питание стимулирует миграцию возбудителя по межклеточным пространствам в базальные мембраны и в клетки органов и ведет к осложнениям возбудителя в организме переносчика.

Иксодовые клещи (Ixodidae) группы *Ixodes ricinus-persulcatus* служат переносчиками и резервуарами возбудителей боррелиозов. Боррелии представляют группу микроорганизмов из отряда спирохет (Spirochetales), широко распространены в границах видовых ареалов клещей-переносчиков в лесном поясе Евразии и Северной Америки. Возбудитель циркулирует в природе между клещами и многими видами наземных позвоночных, включая человека. Передача боррелий осуществляется трансмиссивным путем в период питания клещей.

Впервые возбудитель этой группы был выделен и описан в США в 1984 г., и тогда же была установлена его связь с широко распространенным заболеванием — болезнью Лайма. Несколько позже боррелии были изолированы из клещей *I. ricinus* в странах Западной и Центральной Европы (Burgdorfer, 1992; Gern, 1994). На территории России возбудитель Лайм-боррелиоза был обнаружен в клещах *I. ricinus*, *I. persulcatus*, нескольких видах мелких млекопитающих и у людей с клиническими проявлениями инфекции (Коренберг, 1993). В Северной Америке местные штаммы боррелий относят к геновиду *Borrelia burgdorferi* s. str., а в Европе и России кроме этого вида были также выделены *B. garinii* и *B. afzelii* (Baranton e. a., 1992; Коренберг, 1993; Gern, 1994; Humair e. a., 1995; Tuomi e. a., 1995). Важно отметить, что три указанных вида не только могут передаваться одними и теми же видами клещей, но и встречаются совместно на ограниченных территориях (Крючечников и др., 1993; Москвитина и др., 1995б) и даже в одной особи *I. ricinus* (Pichon e. a., 1996). К сожалению, в большинстве работ точная видовая диагностика возбудителя из-за методических трудностей не проводилась. В большинстве исследований для Европы и России просто констатируется принадлежность возбудителя к группе *B. burgdorferi* s. lato, хотя в клещах чаще обнаруживают *B. afzelii* и *B. garinii*. В настоящей статье мы также ограничиваемся констатацией принадлежности возбудителя из клещей *I. persulcatus* к группе *B. burgdorferi* s. lato.

Трансмиссивный путь передачи боррелий позвоночным требует проникновения возбудителя в слюну питающегося клеща. К сожалению, материалы о локализации боррелий в клещах ограничиваются в основном исследованием мазков из отпрепарованных органов и не раскрывают динамики их накопления и диссеминации в переносчиках. Подобные работы выполнены в основном на отдельных стадиях развития *I. scapularis* и *I. ricinus*. При этом были обнаружены определенные различия в поведении возбудителя в этих видах. Основным местом локализации боррелий служит средняя кишка клеща, из которой они могут при определенных условиях проникать в слюнные железы, яичники и другие внутренние органы (Герп е. а., 1990; Spielman, 1992; Piesman, 1995). С *I. persulcatus* подобные исследования специально не проводились, но имеются данные о большем распространении у этого вида генерализованной формы инфекции и присутствии боррелий в слюнных железах с самого начала питания клещей (Москвитина и др., 1995а; Москвитина и др., 1995б).

К сожалению, анализ локализации боррелий в организме клещей по результатам микроскопирования мазков недостаточно точен, не выявляет их истинного нахождения внутри клеток или на их поверхностях и не позволяет проследить циркуляцию возбудителя на протяжении жизненного цикла переносчика. Исследование локализации боррелий в клещах с использованием техники серебрения является целью настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для наших исследований послужили преимагинальные стадии и взрослые клещи *I. persulcatus*, собранные на флаг с растительности в Ленинградской, Новгородской и Псковской обл. в 1994–1996 гг. Всего исследовано 363 взрослых клеща (202 самки и 161 самец), 27 личинок и 52 нимфы из природных популяций (см. таблицу), а также 50 самок, 62 самца, 130 личинок и 30 нимф, полученных в лаборатории от инфицированных самок из природы. Кусочки кишечника, слюнных желез, мальпигиевых сосудов и яичников от клещей, вскрытых в ванночках с фосфатным буфером (рН 7.2), исследовали в темном поле, фазовом и аноптральном контрастах при увеличении $\times 600$. Из личинок и нимф делали давленные препараты. Материал, в котором обнаруживали боррелий, использовали для приготовления мазков с последующей окраской по модифицированному методу Гимза, что позволило нам сравнить эффективность этих двух методов в обнаружении возбудителя. Определение локализации боррелий в клещах основывали на методике серебрения по Левадиги. Для этого инфицированные органы клещей фиксировали в 10 %-ном формалине и обрабатывали 2 %-ным азотнокислым серебром с последующим восстановлением пирогалловой кислотой. Далее органы клещей заливали в парафин и изготавливали из них срезы толщиной 5 мкм. Срезы заключали в канадский бальзам и просматривали при увеличениях $\times 1200$ и $\times 1500$ в масляной иммерсии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании материала в темном поле и в аноптральном контрасте мы обнаружили боррелий у 87.4 % взрослых клещей: у 191 самки (94.6 %), 129 самцов (80.1 %), а также у 100 % личинок и нимф из природы (см. таблицу). Интересно, что у всех голодных личинок (8 особей) и нимф (5 особей), собранных в 1996 г. с мелких позвоночных, обнаружены боррелии. Наибольшая естественная инфицирован-

Зараженность таежного клеща (*Ixodes persulcatus*) боррелиями по сборам в Ленинградской, Новгородской и Псковской областях (1994–1996 гг.)

Infestation of taiga tick (*Ixodes persulcatus*) with borreliae in Leningrad, Novgorod and Pscov region (1994–1996 years)

	Стадия	1994 г.	1995 г.	1996 г.	В среднем за три года
Количество исследованных клещей, экз.	Личинки	–	7	20	27
	Нимфы	8	3	41	52
	Самки	92	61	49	202
	Самцы	87	44	30	161
	Сумма	187	115	140	442
Из них заражено, экз.	Личинки	–	7	20	27
	Нимфы	8	3	41	52
	Самки	81	61	49	191
	Самцы	57	42	30	129
	Сумма	146	113	140	399
Из них заражено, %	Личинки	–	100	100	100
	Нимфы	100	100	100	100
	Самки	89.1	100	100	94.6
	Самцы	62.7	95.5	100	80.1
	Сумма	80.4	98.3	100	89.8

ность боррелиями отмечена у клещей из сборов в Чудовском р-не Новгородской обл. (98.6 % среди самок и 92.5 % среди самцов). В мазках из органов тех же особей клещей при окрашивании по Гимза боррелий обнаружили лишь в 53.7 % препаратах, что демонстрирует меньшую надежность этого метода.

Обнаруженные в клещах микроорганизмы по форме и размерам можно условно разделить на несколько морфологических типов (см. рисунок, 1; см. вкл.). Все эти формы боррелий встречаются у голодных, питающихся и напитавшихся особей.

I тип – крупные формы ($8-27.5 \times 0.6-0.8$ мкм) с 1 или 2 изгибами, утолщенные, выглядят разбухшими на препаратах в аноптральном контрасте. Боррелии этого типа преобладают над остальными формами в начале сезона активности (конец апреля) и у сильно истощенных особей в конце сезона (конец июня). На протяжении остальной (большей) части периода активности они немногочисленны.

II тип – длинные ($4.5-7 \times 0.2-0.4$ мкм), нитевидные микроорганизмы, изогнутые нерегулярно в 5–7 местах. У этих форм часто наблюдаются поперечные деления. При этом обе равные или неравные ($2/3 + 1/3$ длины) части боррелии располагаются друг к другу под углом в $60-120^\circ$, формируя в месте изгиба зону деления.

III тип – короткие ($2.2-4.3 \times 0.2-0.4$ мкм), палочковидные или слабо изогнутые формы, соответствующие частям делящихся особей, а также тонкие, 5–7-кратно изогнутые ($4.3-5.0 \times 0.2$ мкм). Боррелии II и III типов многочисленны в течение всего периода активности клеща. Они практически отсутствуют только в истощенных особях перед их гибелью, что свидетельствует об естественной девакации

возбудителя. У подобных клещей мы также отмечали появление множества кокков.

IV тип – микроорганизмы спиральной формы, с 5–7 изгибами, $4.3-4.9 \times 0.3-0.5$ мкм. В клещах они встречаются сравнительно редко и только в середине сезона активности имаго.

Концы тела боррелий всех четырех типов незначительно изогнуты (на $80-90^\circ$) от продольной оси. У некоторых особей они утолщены и округлы.

Следует отметить, что на протяжении периода активности взрослых клещей *I. persulcatus* (с конца апреля по июнь) у голодных особей мы наблюдали боррелий всех указанных форм, а также обнаруживали их на всех стадиях цикла развития, в том числе и в клещах, культивируемых в экспериментальных условиях. Деление микроорганизмов не прерывается в периоды подготовки к личиночным и нимфальным линькам, что наблюдалось на лабораторной культуре при бездиапаузном развитии. С началом питания личинок, нимф и самок *I. persulcatus* развитие и размножение боррелий в них продолжается и, по-видимому, стимулируется поступлением пищи в кишечник.

Локализация боррелий в клещах в определенной степени зависит от их физиологического состояния. Эти различия не выявляются при исследовании мазков из целых органов. На витальных препаратах из кишечника клещей в темном поле и на фиксированных после окраски по Гимза постоянно встречаются микроорганизмы II–IV типов, но их локализацию в клетках или полости указанные методики не выявляют. Эту задачу удалось разрешить только при исследовании препаратов из серебрянных органов клещей. *B. burgdorferi* изменяет локализацию в организме хозяина. У голодных особей основным местом сосредоточения возбудителя является апикальная поверхность кишечного эпителия (2). Микроорганизмы распределены на поверхности кишечных клеток неравномерно. Чаще поражается центральный отдел средней кишки и только отдельные участки дивертикулов. Лишь в одном из исследованных клещей мы наблюдали тотальное поражение всей поверхности кишечника (3). Через 12–24 ч после начала кровососания и поступления первых порций крови в полость кишечника начинается переход боррелий с поверхности клеток в область базальной мембраны кишечника. Боррелии мигрируют по многочисленным межклеточным пространствам и накапливаются в области так называемого лабиринта, прилегающего к базальной мембране. Этот процесс становится интенсивным через 2.5 сут после начала питания (4, 5). К концу питания, т. е. на 5–7-е сутки, возбудители практически исчезают с апикальной поверхности кишечных клеток. Лишь изредка на ней встречаются одиночные микроорганизмы. Одновременно возрастает численность боррелий в области базальной мембраны (6).

Продолжением миграции боррелий у питающихся клещей с апикальных поверхностей клеток к базальной мембране, по-видимому, следует считать диссеминацию возбудителя в другие внутренние органы. Этому положению не противоречит явление генерализованной инфекции у значительной части голодных *I. persulcatus*. У 91.6 % из исследованных самок и у 62.1 % самцов боррелии были обнаружены в слюнных железах, у 62.8 % самок – в мальпигиевых сосудах. В слюнных железах голодных самок большинство боррелий располагается на периферии альвеол, в зоне оболочки, тогда как у питающихся особей уже через 2.5 сут после начала кровососания единичные микроорганизмы появляются в секреторных клетках (7). По изучению материала из природных популяций следует отметить, что в альвеолах, содержащих боррелий, патоморфологические изменения не наблюдаются.

В половой системе голодных самок боррелий обнаруживали в соединительно-тканых оболочках яичника (8), в слоях под кутикулярной выстилкой и в базаль-

ной мембране выводных путей (9). Под желточную оболочку яиц (8) они попадают, вероятно, на тех стадиях оогенеза, когда происходит всасывание из гемолимфы экзогенных предшественников желтка.

Если распределение и миграция боррелий в тканях слюнных желез, пищеварительной и половой систем меняются в связи с питанием клеща, то в преференции возбудителя к тканям мальпигиевых сосудов и ректального пузыря такой закономерности не наблюдается. Независимо от степени наполнения их полостей кристаллами гуанина боррелии могут располагаться, как под соединительнотканной оболочкой органов, так и на поверхности эпителиальных клеток мальпигиевых сосудов (10) и выстилки ректального пузыря. У голодных личинок и нимф боррелий находили на апикальной поверхности кишечных клеток, а у питающихся особей – в базальной мембране кишки, в стенке ректального пузыря, в слюнных железах и мальпигиевых сосудах.

Можно предположить, что возбудитель проник в эти внутренние органы еще на нимфальной или даже личиночной стадиях и сохранился при линьках. В дальнейшем при питании самок процесс миграции боррелий из кишечника возобновляется. В результате спустя 3–4 сут после начала кровососания количество боррелий в слюнных железах, яичнике и мальпигиевых сосудах значительно увеличивается.

Следует отметить, что исследования в темном поле голодных и питающихся клещей не выявили возбудителя в гемолимфе. По-видимому, распространение боррелий в организме клеща происходит по соединительнотканным образованиям, сетевидно оплетающим внутренние органы или на поверхности гемоцитов. Этому способствует клеточная адгезия боррелий – наиболее типичное их состояние в организме клеща, связанное с покоем на поверхности тканевых слоев или с передвижением в этих слоях. Это положение демонстрируют приведенные выше фотографии, сообщения об адгезии боррелий на культуре кишечных клеток (Kurtti e. a., 1993) и наше раннее сообщение о пристеночном положении микроорганизмов в периферическом кровеносном русле мелких позвоночных (Григорьева, 1996). При миграции в жидких средах, в кишечном содержимом клеща (11) и в крови позвоночных, боррелии приобретают спирохетообразную форму, но такие организмы (IV тип) в клещах обнаруживаются крайне редко.

Наряду с миграцией по межклеточным пространствам боррелии способны проходить и сквозь разные типы клеток клещей. Как обнаружено на клеточных культурах (Kurtti e. a., 1994), возбудитель находится внутри цитоплазмы в окруженной оболочкой вакуолях, которые не сливаются с лизосомами. При контакте подобных вакуолей с цитоплазматической мембраной оболочка вакуоли сливается с мембраной, и боррелии освобождаются наружу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ распределения боррелий в организме *I. persulcatus* выявил четкую связь накопления и локализации возбудителя с физиологическим состоянием клеща-переносчика. Питание клещей стимулирует миграцию боррелий с поверхности кишечных клеток к базальной мембране кишечника, их накопление и дальнейшую миграцию в другие внутренние органы. Возбудитель локализуется и мигрирует по многочисленным межклеточным пространствам в стенке средней кишки, слюнных железах и других внутренних органах клеща. Нами обнаружена локализация боррелий внутри кишечных клеток таежного клеща (12), но этот вопрос требует дополнительного изучения. Межклеточный путь миграции возбудителя был ранее описан в клещах *I. ricinus* (Zung e. a., 1989). Способность возбу-

теля сохраняться в слюнных железах и других органах на стадии линьки объясняет существование генерализованной инфекции у голодных особей и ее усиление с последующим питанием. Соответственно клещи этого вида потенциально способны к передаче боррелий позвоночным сразу после прикрепления или в начале кровососания. Указанная особенность характерна для *I. persulcatus*, тогда как у *I. ricinus* (Zung e. a., 1989) и особенно *I. scapularis* (Gern e. a., 1990; Piesman, 1995) генерализация инфекции и сохранение возбудителя в слюнных железах голодных особей встречаются значительно реже. Экспериментально показано, что у инфицированных нимф *I. scapularis* слюнные железы содержали инфицирующие стадии *B. burgdorferi* не ранее, чем через 60 ч с начала питания (Piesman, 1995). По-видимому, присутствие боррелий в слюнных железах голодных *I. persulcatus* определяет более высокую эффективность этого вида в передаче возбудителя Лайм-боррелиоза по сравнению с *I. ricinus* и *I. scapularis*.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ, Россия и FIRCA, США.

Список литературы

- Григорьева Л. А. Землеройки как резервуар боррелий на северо-западе России // Паразитология. 1996. Т. 30, вып. 5. С. 470–472.
- Коренберг Э. И. Проблема болезни Лайма в России // Проблемы клещевых боррелиозов. М., 1993. С. 13–21.
- Крючечников В. Н., Горелова Н. Б., Щербakov С. В. Идентификация боррелий и итоги изучения изолятов возбудителя болезни Лайма из России и сопредельных стран // Проблемы клещевых боррелиозов. М., 1993. С. 45–56.
- Москвитина Г. Г., Коренберг Э. И., Горбань Л. Я. Присутствие боррелий в кишечнике и слюнных железах спонтанно зараженных взрослых клещей *Ixodes persulcatus* Schulze при кровососании // Мед. паразитол. 1995а. № 3. С. 16–20.
- Москвитина Г. Г., Коренберг Э. И., Спилман Э., Щеголева Т. В. О частоте генерализованной инфекции у взрослых голодных клещей рода *Ixodes* в очагах боррелиозов России и США // Паразитология. 1995б. Т. 29, вып. 5. С. 353–360.
- Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J.-C., Assous M., Grimont P. A. D. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis // Intern. J. System. Bacter. 1992. Vol. 42, N 3. P. 378–383.
- Burgdorfer W. Vector/spirochete relationships of arthropod-borne borrelioses // First International Conference on Tick-Borne Pathogens at the Host-Vector Interface: an Agenda for Research. Saint Paul, Minnesota, 1992. P. 111–120.
- Gern L. Certainty and uncertainty about ecology, epidemiology and control of lyme borreliosis // Advances in Lyme Borreliosis Research. VI Intern. Confer. on Lyme Borreliosis (Bologna, Italy, June 19–22, 1994). 1994. P. 199–204.
- Gern L., Zhu Z., Aeschlimann A. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding // Ann. Parasitol. Hum. Comp. 1990. Vol. 65, N 2. P. 89–93.
- Humair P.-F., Peter O., Wallich R., Gern L. Strain Variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland // J. Med. Entomol. 1995. Vol. 32, N 4. P. 433–438.
- Kurtti T. J., Munderloh U. G., Krueger D. E., Johnson R. C., Schwan T. G. Adhesion to and invasion of cultured tick (Acarina: Ixodidae) cells by *Borrelia*

- burgdorferi (Spirochaetales: Spirochaetacea) and maintenance of infectivity // J. Med. Entomol. 1993. Vol. 30, N 3. P. 586–596.
- Kurtti T. J., Munderloh U. G., Hayes S. F., Krueger D. E., Ahlsrand G. G. Ultrastructural analysis of the invasion of tick cells by Lyme disease Spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in vitro // Can. J. Zool. 1994. Vol. 72, N 6. P. 977–994.
- Pichon B., Godfroid G., Hoyois B., Perez-eid C. Simultaneous infection of *Ixodes ricinus* nymphs by two *Borrelia burgdorferi* sensu lato species // VII Intern. Congress on Lyme Borreliosis (June 16–21, 1996, San Francisco, California). Abstracts, 1996. P. 100.
- Piesman J. Dispersal of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* to salivary glands of feeding nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) // J. Med. Entomol. 1995. Vol. 32, N 4. P. 519–521.
- Spielman A. Development of Lyme disease spirochetes in vector ticks // First International Conference on Tick-Borne Pathogens at the Host-Vector Interface: an Agenda for Research. Saint Paul, Minnesota, 1992. P. 47–53.
- Tuomi J., Rantamaki L. K., Tanskanen R., Junntila J. Characterization of finnish *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and with monoclonal antibodies // J. Clin. Microbiol. 1995. Vol. 33, N 8. P. 1989–1996.
- Zung J. L., Lewengrub S., Rudzinska M. A., Spielman A., Telford S. R., Piesman J. Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini* // Can. J. Zool. 1989. Vol. 67. P. 1737–1748.

ЗИН РАН, Санкт-Петербург, 199034;
Университет Южной Джорджии,
Статсборо, США

Поступила 10.11.1996

LOCATION OF BORRELIAE IN DIFFERENT STAGES OF THE TICK *IXODES PERSULCATUS*

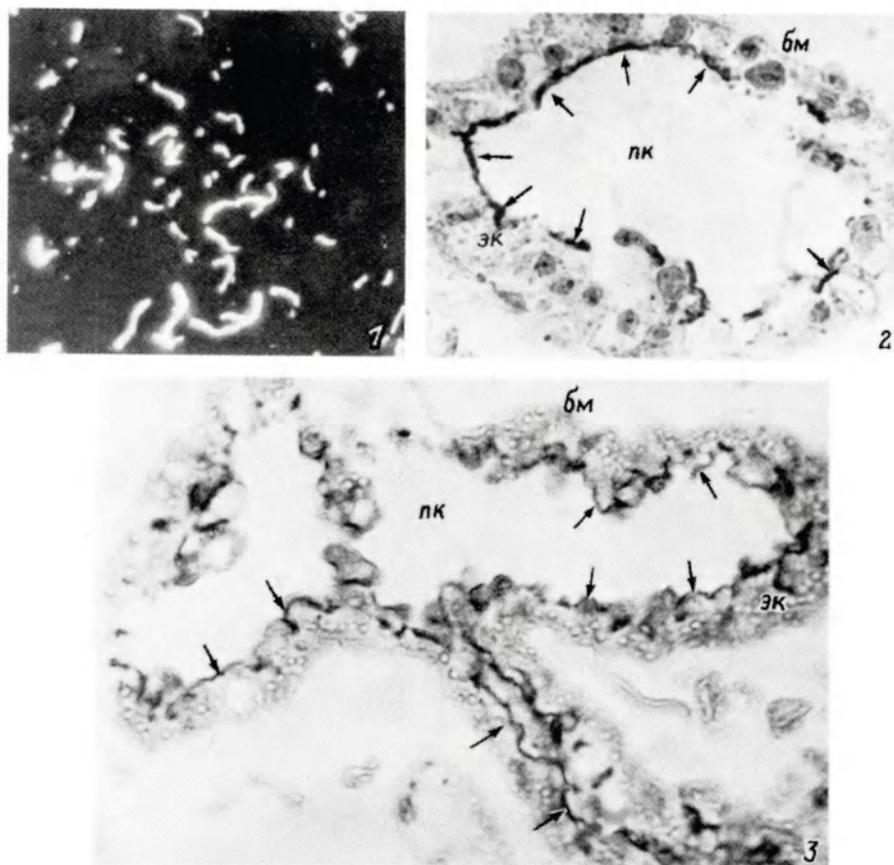
Yu. S. Balashov, L. A. Grigoryeva, J. H. Oliver

Key words: *Borrelia burgdorferi* s. lato, morphological types, *Ixodes persulcatus*, location in ticks.

SUMMARY

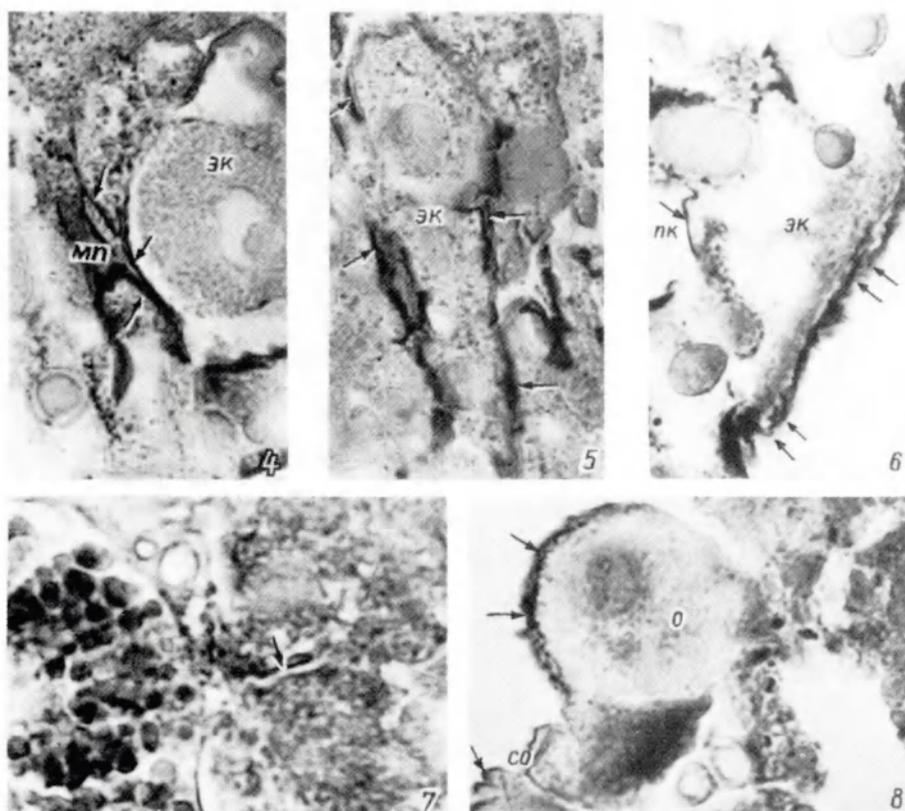
Borrelia burgdorferi s. lato have been recovered by means of an observations in a dark screen, phase and anoptrail contrasts in 87.47 % imago and 100 % nymphs and larvae of the *Ixodes persulcatus* ticks collected in the Leningrad, Novgorod and Pskov regions. Four morphological types of borreliae have been recognized, which were present in all stages of ticks examined. The location of the agent in ticks was examined in the material coloured after Levaditi. In the hungry stages the most abundance of the agent was accumulated at the apical surface of midgut epithelium. In the majority of hungry *I. persulcatus* the generalized infection was recorded. The feeding stimulates the migration of the agent through the intracell space to the basal membrane and cells of organs and finally leads to complication of the agent in the organism of vector.

Вклейка к ст. Балашов Ю. С. и др.



Borrelia burgdorferi s. lato из средней кишки *Ixodes persulcatus*.

1 — боррелии на прижизненном давленном препарате в темном поле (×600); 2 — поперечный срез отростка средней кишки голодной самки (×1500), на этой и следующих микрофотографиях с препаратов, серебрянных по Левадиту, боррелии указаны стрелками; 3 — косой срез через центральный участок и место ответвления дивертикулов средней кишки голодной самки (×480).



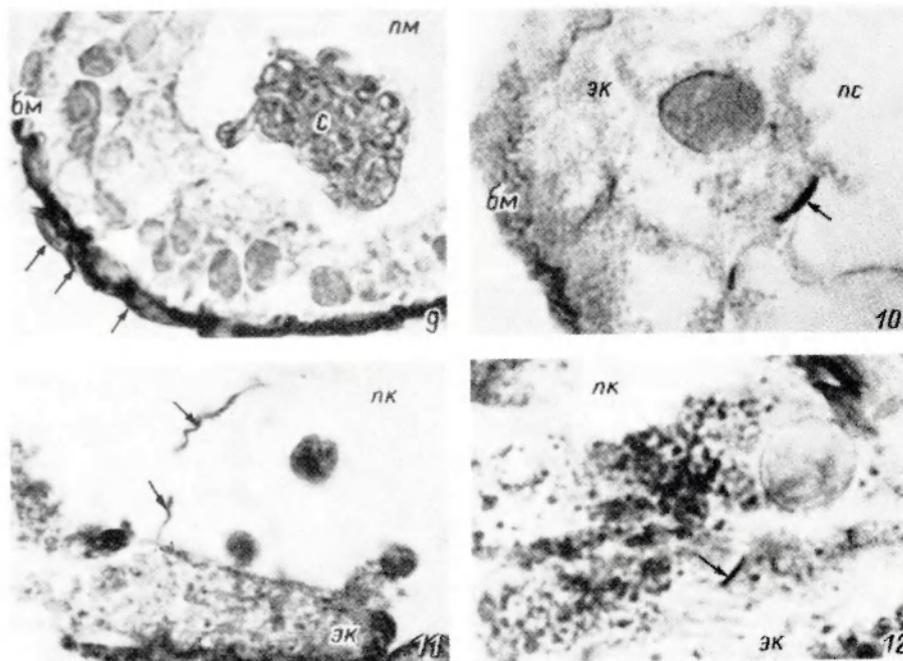
Продолжение подписи

4, 5 – срез стенки средней кишки самки клеща через 2,5 сут после начала кровососания (×1500);
 6 – поперечный срез через стенку средней кишки напивавшейся самки клеща (×1500); бм –
 базальная мембрана; мп – межклеточные пространства; о – ооцит; пк – полость кишки; лм –
 полость матки; пс – полость мальпигиевого сосуда; с – спермии; со – соединительнотканная
 оболочка яичника; эк – эпителиальные клетки.

Borrelia burgdorferi s. lato from midgut of *Ixodes persulcatus*.

Borrelia burgdorferi s. lato из внутренних органов *Ixodes persulcatus*.

7 – срез через альвеолы слюнной железы самки через 2,5 сут после начала питания (×1500);
 8 – срез через участок яичника самки клеща через 2,5 сут после начала кровососания (×1500).



Продолжение подписи

9 – поперечный срез цервикального отдела матки голодной самки (×1500); 10 – срез через стенку мальпигиева сосуда самки через 2,5 сут после начала кровососания (×1500); 11 – боррелия спирохетообразной формы в полости средней кишки самки через 5 сут после начала кровососания (×1500); 12 – срез через стенку средней кишки самки через 2,5 сут после начала питания с внутриклеточной локализацией боррелии (×1500).

Borrelia burgdorferi s. lato from internal organs of *Ixodes persulcatus*.