

УДК 576.895.42 + 579.83.114

ТРАНСОВАРИАЛЬНАЯ И ТРАНСФАЗОВАЯ ПЕРЕДАЧИ БОРРЕЛИЙ
ТАЕЖНЫМ КЛЕЩОМ *IXODES PERSULCATUS* (IXODIDAE)

© Ю. С. Балашов, Л. И. Амосова, Л. А. Григорьева

Методами темнопольной и фазово-контрастной микроскопии и непрямой реакции иммунофлуоресценции с моноклональными антителами исследована зараженность боррелиями особей 3 лабораторных поколений клещей от инфицированных в природе самок *I. persulcatus*. Локализация боррелий в ооцитах исследована методами электронной микроскопии. Клещи происходили от 9 самок родительского поколения, собранных в природе в Новгородской обл., а также 6 самок первого и 5 второго лабораторных поколений. Всего были исследованы 250 личинок, 178 нимф, 59 самок и 70 самцов трех последовательных генераций. Почти 100 % потомства инфицированных самок было заражено *Borrelia burgdorferi* s. l., и столь же высокая инфицированность обнаружена у собранных в природе голодных личинок. Полученные трансовариально боррелии передавались от личинок по циклу развития 100 % нимф и имаго и далее особям 2 следующих поколений.

Возбудители трансмиссивных инфекций являются естественными компонентами природных экосистем, где они циркулируют между дикими животными и клещами и образуют природные очаги инфекций. Иксодовые клещи служат не только переносчиками многих видов возбудителей, но также выполняют функции их амплификаторов и природных резервуаров. Циркуляция возбудителей в очаге частично может происходить за счет только одних клещей, передающих патогены вертикально своему потомству (трансовариальная передача). К числу подобных инфекций относится и Лайм-боррелиоз, широко распространенный по всей лесной зоне России. Возбудителями этой инфекции служат боррелии, объединяемые в группу *Borrelia burgdorferi* s. l., которая включает несколько видов (*B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s. str. и др.), а их переносчиками служат клещи рода *Ixodes*. Инфицирование клещей этими возбудителями происходит при питании на инфицированных хозяевах, а также при совместном питании инфицированных и неинфицированных особей на незараженном ранее животном (Gern, Rais, 1996).

Эффективность трансовариальной передачи оценивают по проценту самок, передавших возбудителя потомству, или по доле инфицированных личинок от одной самки. Оба эти показателя очень сильно варьируют в зависимости от видовой принадлежности партнеров, интенсивности заражения переносчика, особенностей диссеминации возбудителя в организме и многих других факторов. В США боррелии были обнаружены менее чем у 1 % собранных в природе голодных личинок *I. scapularis* (Lane e. a., 1991). Среди 1499 собранных в природе и накормленных на кролике самок *I. pacificus* зараженными оказались 132 напитавшиеся особи (8.8 %), но в полученных от них личинках боррелии во всех случаях не выявлены (Shoeler, Lane, 1993). В Европе у голодных личинок *I. ricinus*, собранных с растительности, инфицированность боррелиями сильно варьирует и составляет в Германии 1 % (Kurtenbach e. a., 1995), в Швейцарии — 3.1 % (Zhioua e. a., 1994), во Франции — 4.8 % (Doby e. a., 1989) и 6.3 % — в Чехии (Halouzka e. a., 1995). В то же время в Швеции обнаружить инфицированных личинок в природе не удалось (Mejlon, Jaenson, 1993).

Данные лабораторных экспериментов по трансвариальной передаче боррелий значительно варьируют в зависимости от видовой принадлежности возбудителей и клещей. Например, у напитавшихся инфицированных самок *I. ricinus* трансвариальная передача обнаружена у 3 из 156 (1.9 %) особей, в кладках которых от 43 до 65 % яиц содержали боррелий (Bellet-Edimo e. a., 1996). Напротив, у *I. hexagonus* 17 (81 %) из 21 самки, напитавшейся на еже, передали боррелий личинкам. Однако зараженность личинок составляла в среднем только 7 % (Gern e. a., 1996).

Роль трансвариальной передачи боррелий клещами в природных очагах инфекции, по-видимому, определяется многими факторами и в первую очередь видовой принадлежностью переносчика и боррелии. Так, в европейских очагах боррелиоза трансвариальная передача боррелий считается одним из главных механизмов циркуляции возбудителя в природе (Randolph, Craine, 1995), а в Северной Америке ей придают второстепенное значение (Mount e. a., 1997).

Обязательным условием сохранения боррелий в популяции клещей и их передачи позвоночным животным, безотносительно к существованию трансвариальной передачи, должна быть достаточно эффективная трансфазовая передача возбудителя от напитавшихся личинок перелинявшим из них нимфам и от нимф—имаго. От напитавшихся личинок, инфицированных боррелиями, возбудителя получали около 100 % перелинявших из них нимф *I. ricinus* (Stanek e. a., 1986), у *I. pacificus* — до 100 % нимф и имаго (Lane, Burgdorfer, 1987) и у *I. hexagonus* — 70.2 % нимф (Gern e. a., 1991). У *I. persulcatus*, по данным Коренберга и др. (1988), инфицированность имаго, перелинявших из нимф, собранных в природе, составила всего 4 %.

Данные о способности к трансвариальной и трансфазовой передачам боррелий их главным переносчиком в России — клещом *Ixodes persulcatus* в литературе отсутствуют или ограничены разрозненными наблюдениями. Восполнение этого пробела является задачей настоящего исследования.

Имаго собирали в мае—июне 1994—1995 гг. в Новгородском и Чудовском р-нах Новгородской обл. с травянистой растительности на флаг. За период с 1994 по 1997 г. с применением метода темного поля исследованы 285 самок, собранных в природе, из которых 272 (95.4 %) были инфицированы боррелиями. У 256 (94 %) инфицированных голодных самок отмечена генерализованная инфекция и обнаружены боррелии в яичниках. Столь высокие показатели инфицированности в природе и диссеминация боррелий во многие внутренние органы отличают *I. persulcatus* от других видов группы *I. ricinus*—*persulcatus* и требуют своего объяснения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

На зараженность боррелиями обследовано потомство 20 инфицированных боррелиями самок *I. persulcatus*, включая 9 самок, собранных в природе, а также 6 самок первого и 5 — второго лабораторных поколений. Всего микроскопическими методами исследованы 250 личинок, 178 нимф, 59 самок и 70 самцов трех последовательных генераций, выращенных в культуре. Преимагинальные фазы кормили на белых мышах, имаго — на кроликах. Клещей содержали в эксикаторах с насыщенным раствором сульфата натрия при 97 %-ной влажности и 21—23° в режиме 16 ч света и 8 ч темноты. При отлове мелких млекопитающих из природы собрано 77 голодных личинок таежного клеща.

Из личинок и нимф готовили прижизненные давленные препараты, которые просматривали в режимах фазового контраста (см. рисунок, 1, 3; см. вкл.) или темного поля (5, 6). Имаго вскрывали в парафиновых ванночках с фосфатным буфером (рН 7.2). Отдельно исследовали пробы из каждого органа (кишечник, слюнные железы, яичник, нервный ганглий, мальпигиевы сосуды) для выяснения степени генерализации инфекции.

Часть препаратов после фиксации в холодном ацетоне исследовали в непрямой реакции иммунофлуоресценции (ИРИФ) с моноклональными антителами (МА) H605 на флагелиновые белки спирохет рода *Borrelia* и H5332 на ospA поверхностной

оболочки *Borrelia burgdorferi* s. l. Серологические тесты проведены с соблюдением положительного (на *B. burgdorferi* s. str., В—31) и отрицательного (на *B. hermsii*) контролей. В нРИФ (2, 4) исследовали мазки от 50 личинок, 50 нимф, 20 самок и 20 самцов первого поколения; от 50 личинок, 10 нимф, 10 самок и 10 самцов из второй генерации и от 10 личинок и 10 нимф из третьей генерации лабораторной культуры, а также от 77 голодных личинок из природы.

Яичники части напитавшихся инфицированных самок были исследованы на присутствие боррелий в электронном микроскопе (7—10). Отпрепарованные кусочки яичников фиксировали 2.5 %-ным глутаровым альдегидом на фосфатном буфере с дофиксацией осмием. Дальнейшая обработка проводилась по обычной методике с заливкой в эпон. Ультратонкие срезы контрастировались водным раствором уранил-ацетата и цитрата свинца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У всех 120 (100 %) голодных личинок первой генерации из потомства 9 собранных в природе самок выявлены боррелии (1) (см. таблицу), которых они могли получить только от инфицированных самок родительского поколения. Способность к трансовариальной передаче обнаружена и у самок второго (4) и третьего лабораторных поколений. Возбудитель был выявлен также у всех 100 исследованных личинок второй генерации, потомства 6 самок и 30 (100 %) личинок третьей генераций (2) от 5 самок. Голодные личинки могли получить возбудителя только от самок родительского поколения. Боррелии должны были проникнуть в развивающиеся яйца, а из последних перейти в голодных личинок. При этом постоянно наблюдалась откладка инфицированных яиц всеми подопытными самками при 100 %-ной пораженности личинок.

Исследование на зараженность боррелиями собранных в природе голодных личинок *I. persulcatus* подтвердили результаты лабораторных исследований. Все 77 голодных личинок, собранных летом 1997 г., оказались зараженными боррелиями. Столь высокая эффективность трансовариальной передачи не известна для других видов рода *Ixodes*. Обязательным условием трансовариальной передачи боррелий должна быть генерализация инфекции в организме клеща и проникновение возбудителя в развивающиеся ооциты. Постоянным местообитанием боррелий в организме иксодиды является средняя кишка, но у части особей возбудитель проникает в другие внутренние органы, в том числе в слюнные железы и яичник. Частота подобной генерализованной инфекции существенно отличается у разных видов. В США при общей невысокой инфицированности клещей у *I. scapularis* генерализованная инфекция обнаружена только у 2.2 % инфицированных особей, а у *I. pacificus*, напротив, у 32 % (Burgdorfer e. a., 1988). В Европе у *I. ricinus* этот показатель составил 5.5 % (Burgdorfer e. a., 1988). Таежный клещ отличается от других видов высокой частотой генерализации боррелиемии. По данным Москвитиной и др. (1995), она обнаружена у 12.9 % особей, а по нашим наблюдениям — у 94 % исследованных самок. Таким образом, высокая частота генерализации инфекции у *I. persulcatus* обеспечивает исключительно высокую по сравнению с другими видами частоту трансовариальной передачи боррелий.

При электронно-микроскопическом исследовании самок через 6 и 10 сут после начала питания боррелии были обнаружены в яичниках. Возбудители были локализованы в клетках ножки и внутри прикрепленных к ним ооцитов разных стадий развития. В клетках ножки количество боррелий было гораздо больше, чем внутри ооцитов. Так, если в ооцитах в одном поле зрения при минимальном увеличении электронного микроскопа в 2300 раз обычно наблюдались 1—2 особи (7) и лишь изредка можно было увидеть 10—12 боррелий, то в клетках ножки их число достигало нескольких десятков при том же увеличении (8). Ооциты, в которых были обнаружены боррелии, находились либо на стадии, предшествующей началу вителлогенеза, либо на ранних стадиях образования желтка. Можно предположить, что на

более поздних этапах вителлогенеза боррелии, по-видимому, также содержатся в ооцитах, но их трудно обнаружить из-за заполняющих клетку многочисленных гранул желтка.

Форма клеток боррелий на срезах разнообразна и зависит от плоскости среза. Соответственно она варьирует от круглых профилей на поперечном срезе до почти прямых палочкообразных или дугообразных при продольном срезе (9, 10). Интересно отметить, что «прямые» фрагменты боррелий чаще наблюдались в ооцитах. Диаметр боррелий колебался от 0.22 до 0.3 мкм. Фрагменты их тела на срезах достигали 2.8 мкм максимальной длины, при общей длине боррелии до 27.5 мкм, по данным прижизненных измерений в фазовом контрасте (Балашов и др., 1997).

Ультраструктура боррелий в основном сходна с ранее описанной для этих микроорганизмов (Zung e. a., 1989). Клетка окружена двумя мембранами, внешняя из которых, как принято считать (Zung e. a., 1989; Munderloh, Kurtti, 1995), принадлежит клетке хозяина, а внутренняя — боррелии. Внешняя мембрана обычно складчатая, в связи с чем размер околоклеточного пространства непостоянен. Следует отметить, что нами не наблюдалось асимметричного положения боррелий внутри пространства, ограниченного мембраной хозяина. Цитоплазма боррелий неоднородна, в ней имеются участки разной электронной плотности. В более плотных содержатся многочисленные рибосомы, а в менее плотных, как принято считать, располагается «ядерный» материал. В них иногда видны электронноплотные тельца и фибриллярные структуры (9, 10).

Электронно-микроскопические данные свидетельствуют о заселении боррелиями клеток яичников инфицированных самок и развивающихся в них яиц. По-видимому, возбудитель успешно размножается в эпителиальных клетках стенок яичника, к которым относятся и клетки ножки. В ооциты боррелии могут проникать из клеток ножки или соединительнотканной оболочки органа. Это возможно на ранних стадиях оогенеза, до того как ооцит окружается наружной непроницаемой оболочкой — хорионом.

Обращает на себя внимание исключительно эффективная 100 %-ная трансфазовая передача возбудителя, который не исчезал при линьках клещей. Боррелии, полученные личинками трансвариально от самок, сохранялись в их организме во время питания и далее передавались по циклу развития клещей на протяжении трех последовательных поколений (срок наблюдений). После питания и линьки личинки всех трех поколений передавали возбудителя 100 % нимф, а нимфы — 100 % имаго (см. таблицу). Передача возбудителя по циклу развития клеща может обеспечиваться размножением боррелий в организме клеща на каждой фазе развития и передачей их при линьке следующей фазе. Наблюдавшаяся 100 %-ная трансфазовая передача боррелий, возможно, подкрепляется дополнительным перезаражением личинок при их совместном питании на одной особи хозяина, и далее по циклу развития — нимф и самок.

Из представленного материала очевидно, что вид *I. persulcatus* обладает исключительной способностью к трансвариальной передаче боррелий из группы *Borrelia*

Зараженность боррелиями потомства инфицированных самок *Ixodes persulcatus*
Number of infected in progeny of females *Ixodes persulcatus* infected with borreliae

Фаза развития и пол клещей	Поколения клещей и количество исследованных особей		
	F1 от 9 самок	F2 от 6 самок	F3 от 5 самок
Личинки	120 (120)	100 (100)	30 (30)
Нимфы	100 (100)	58 (58)	20 (20)
Самки	36 (36)	23 (23)	
Самцы	60 (59)	10 (10)	

Примечание. Первое число — количество исследованных клещей, число в скобках — количество клещей с боррелиями.

burgdorferi s. l. Почти 100 % потомства инфицированных самок были заражены боррелиями и столь же высокая инфицированность обнаружена у собранных в природе голодных личинок. Полученные трансовариально боррелии передавались по циклу развития клеща нимфам и имаго, и далее особям двух следующих поколений. Остается открытым вопрос, характерна ли трансовариальная передача для всех боррелий или только определенных видов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проекты № 96-04-48389 и 96-15-97882.

Список литературы

- Балашов Ю. С., Григорьева Л. А., Оливер Дж. Х. Локализация боррелий в организме клеща *Ixodes persulcatus* на разных стадиях развития // Паразитология. 1997. Т. 31, вып. 2. С. 97—103.
- Коренберг Э. И., Щербаков С. В., Ковалевский Ю. В., Крючечников В. Н., Никитина О. В. Передача *Borrelia burgdorferi* от нимф к имаго у клеща *Ixodes persulcatus* Schulze // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302, № 3. С. 759—760.
- Москвитина Г. Г., Коренберг Э. И., Спилман Э., Щеглова Т. В. О частоте генерализованной инфекции у взрослых голодных клещей рода *Ixodes* в очагах боррелиозов России и США // Паразитология. 1995. Т. 29, вып. 5. С. 353—359.
- Bellet-Edimo R., Gern L., Betschart B. Frequency and efficiency of transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* // VII Intern. Congr. Lyme borreliosis. San Francisco. 1996. P. 39.
- Burgdorfer W., Hayes S. F., Benach J. L. Development of *Borrelia burgdorferi* in ixodid tick vectors // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1988. Vol. 539. P. 172—179.
- Doby J. M., Imbert-Hameurt C., Jeanne B., Chevrier S. Infection de *Ixodes ricinus* par *Borrelia burgdorferi*, agent des spirochetoses a tique (maladie de Lyme et autres formes cliniques) dans l'Quest de la France. I. Resultats globaux de l'examen de 2320 tiques // Bull. Soc. Fran. Parasit. 1989. Vol. 7, N 1. P. 111—125.
- Gern L., Marval, de F., Aeschlimann A. Comparative considerations on the epidemiology of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in Switzerland // Modern Acarology, Prague. 1991. Vol. 1. P. 249—254.
- Gern L., Rais O. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks // J. Med. Entomol. 1996. Vol. 33, N 2. P. 189—192.
- Gern L., Rouvinez E., Toutoungi L. N. Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and in *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* // VII Intern. Congr. Lyme borreliosis. San Francisco, 1996. P. 40.
- Halouzka J., Juricova Z., Matilova L., Hubalek Z. Borreliiae in larval *Ixodes ricinus* ticks // Med. Vet. Entomol. 1995. Vol. 9, N 2. P. 205—206.
- Kurtenbach K., Kampen H., Dizij A., Arndt S., Seitz H. M., Schaible U. E., Simon M. M. Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s. l. in German Woodlands // J. Med. Entomol. 1995. Vol. 32, N 6. P. 807—817.
- Lane R. S., Burgdorfer W. Transovarial and transstadial passage of *Borrelia burgdorferi* in the western black-legged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) // Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987. Vol. 37, N 1. P. 188—192.
- Lane R. S., Piesman J., Burgdorfer W. Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe // Ann. Rev. Entomol. 1991. Vol. 36. P. 587—609.
- Mejlon H. A., Jaenson T. G. T. Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation types of Sweden // Scand. J. Infect. Dis. 1993. Vol. 25, N 5. P. 449—456.
- Mount G. A., Haile D. G., Daniels E. J. Simulation of Blacklegged tick (Acari: Ixodidae) population dynamics and transmission of *Borrelia burgdorferi* // J. Med. Entomol. 1997. Vol. 34, N 4. P. 461—484.
- Munderloh U. G., Kurtti T. J. Cellular and mollecular interrelationships between ticks and prokaryotic tick-borne pathogens // Ann. Rev. Entomol. 1995. Vol. 40. P. 221—243.
- Randolph S. E., Craine N. G. General framework for comparative quantitative studies on transmission of tick-borne diseases using Lyme borreliosis in Europe as an example // J. Med. Entomol. 1995. Vol. 32, N 6. P. 765—777.

- Shoeler J. B., Lane R. S. Efficiency of transovarial transmission of Lyme diseases spirochete *Borrelia burgdorferi* in the Western black legged tick, *Ixodes pacificus* // J. Med. Entomol. 1993. Vol. 30, N 1. P. 80—86.
- Stanek G., Burger I., Hirschl A., Wewalka G., Radda A. *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle // Zbl. Bakteriол., Microbiol. Und Hyg. 1986. Bd A263, N 1—2. S. 29—33.
- Zhioua E., Aeschlimann A., Gern L. Infection of field-collected *Ixodes ricinus* larvae with *Borrelia burgdorferi* in Switzerland // J. Med. Entomol. 1994. Vol. 31, N 6. P. 763—766.
- Zung J. L., Lewengrub S., Rudzinska M. A., Piesman J., Spielman A., Telford S. R. 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, N 12. P. 1737—1748.

ЗИН РАН, Санкт-Петербург, 199034

Поступила 12.06.1998

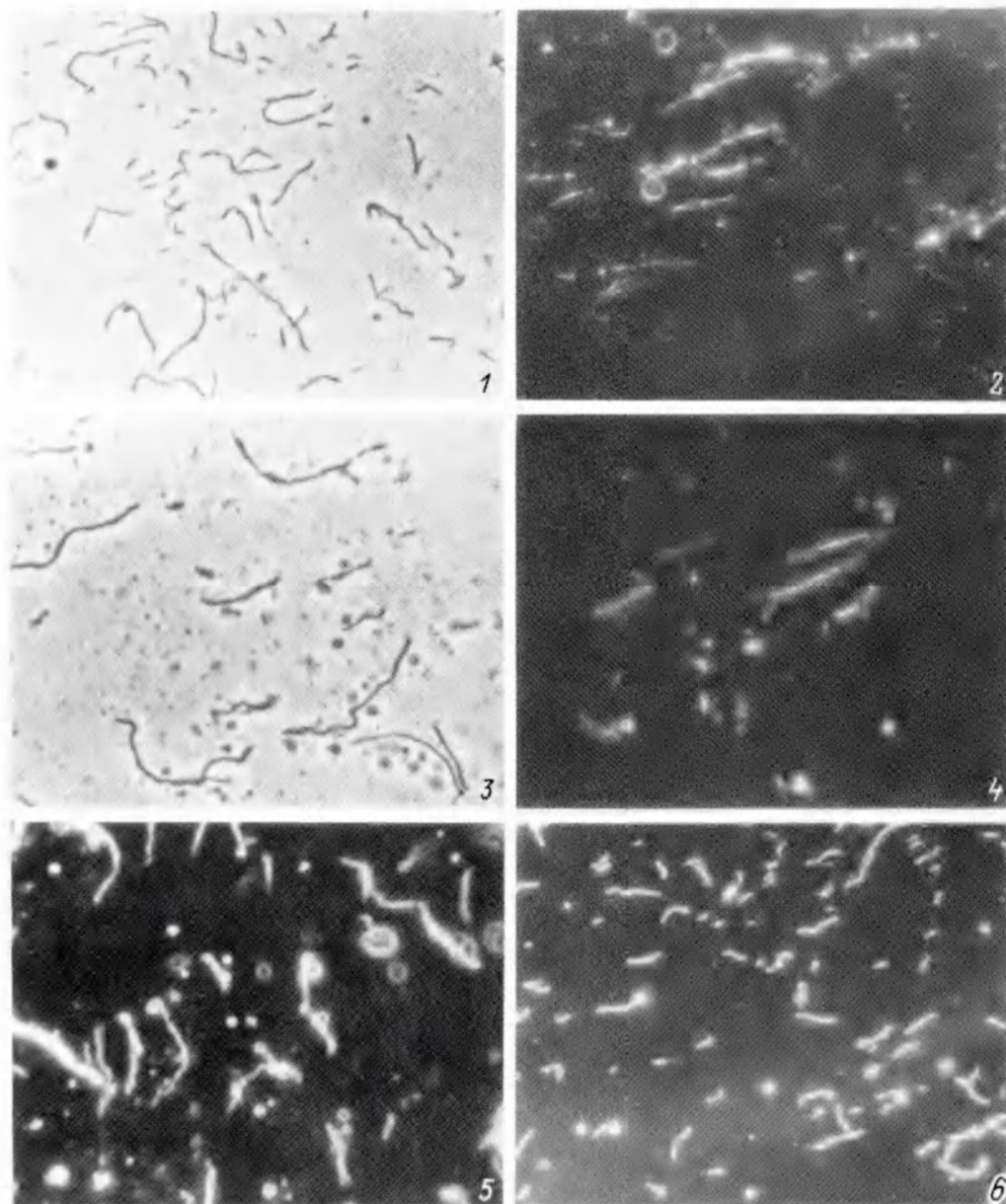
TRANSOVARIAL AND TRANSPHASE TRANSMISSIONS OF BORRELIAE BY THE TAIGA TICK *IXODES PERSULCATUS* (IXODIDAE)

Yu. S. Balashov, L. I. Amosova, L. A. Grigoryeva

Key words: *Borrelia burgdorferi* s. l., *Ixodes persulcatus*, transovarial transmission, transphase transmission.

SUMMARY

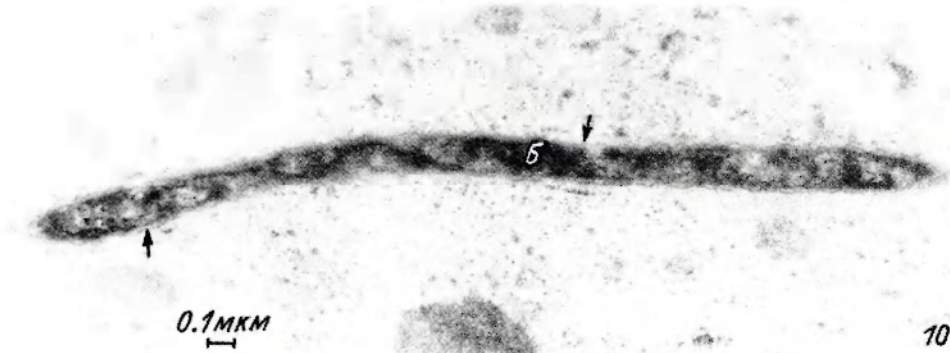
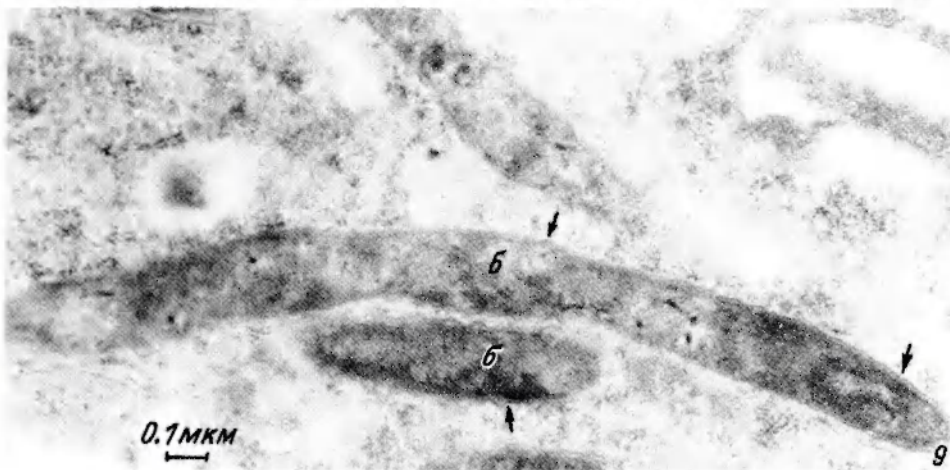
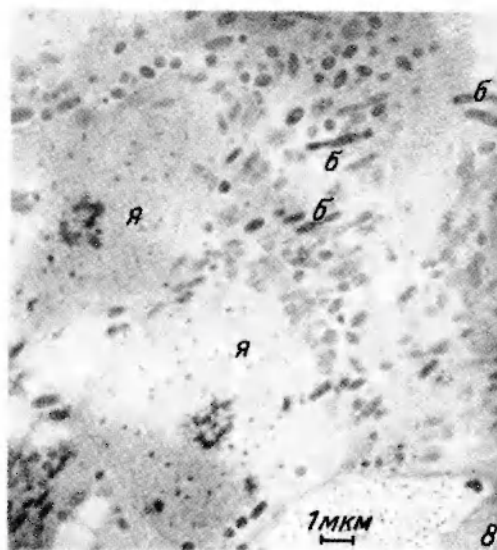
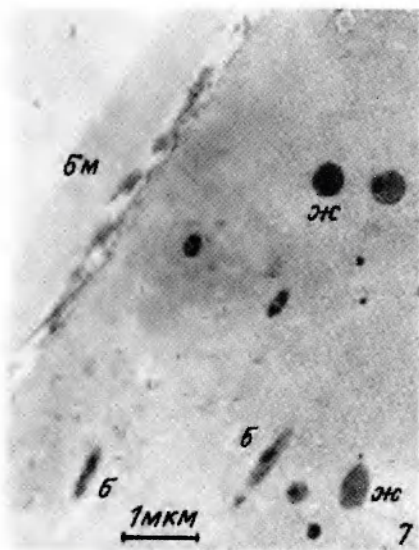
Three generations of the taiga tick *Ixodes persulcatus*, the descendants from naturally infected females, have been examined by means of dark field and phase contrast microscopies and indirect immunofluorescent reactions with monoclonal antibodies. Location of borreliae in oocytes was examined by means of electron microscopy. The examined ticks derived from 9 females collected in the Novgorod region, from 6 females of 1-st laboratory generation and 5 females of the 2-nd generation. In total, 250 larvae, 178 nymphs, 59 females and 70 males of three consequent generation have been examined. Almost 100 % of descendants of naturally infected females were infected with *Borrelia burgdorferi* s. l. and similar infection rate was observed in unfed tick larvae collected in field conditions. The borreliae received transovarially to larvae of the 1-st generation then were transmitted to 100 % nymphs and imago of this generation and two next generations.



Borrellia burgdorferi s. l. из клещей *Ixodes persulcatus* на прижизненных давленных препаратах (1—6, $\times 600$) и на срезах в электронном микроскопе (7—10).

1 — боррелии из голодной личинки 1-й лабораторной генерации, фазовый контраст; 2 — боррелии из голодной личинки 3-й лабораторной генерации, непряная реакция иммунофлуоресценции; 3 — боррелии из голодной самки 1-й лабораторной генерации, фазовый контраст; 4 — боррелии из голодной самки 2-й лабораторной генерации, непряная реакция иммунофлуоресценции; 5 — боррелии из самца 2-й лабораторной генерации, темное поле; 6 — боррелии из голодной нимфы 3-й лабораторной генерации, темное поле; 7, 10 — боррелии в ооците; 8, 9 — боррелии в клетках ножки ооцита; б — боррелии; бм — базальная мембрана ооцита; ж — гранула желтка; я — ядро; стрелки — мембрана клетки нижнего ооцита вокруг боррелии.

Borrellia burgdorferi s. l. from ticks *Ixodes persulcatus* in vital slides (1—6, $\times 600$) and under electron microscope (7—10).



Продолжение рисунка