

Трансовариальная и трансфазовая передача боррелий из группы *Borrelia burgdorferi sensu lato* европейским лесным клещем, *Ixodes ricinus* L., 1758 (Acari: Ixodidae)

²Митева О. А., ¹Григорьева Л. А., ²Мясников В.А., ²Гоголевский А.С.

¹Зоологический институт РАН

²Государственный Научно-исследовательский испытательный институт военной медицины
МО РФ

Спирохеты комплекса *B. burgdorferi* s.l. являются возбудителями иксодового клещевого боррелиоза и передаются иксодовыми клещами из рода *Ixodes* (Acari: Ixodidae). В Евразии широкое географическое распределение боррелиоза определяют два вида переносчиков: *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Уровни инфицирования популяции взрослых клещей *I. ricinus* возбудителями разными авторами оцениваются от 8 до 33 % (в редких случаях до 60 %) (Vasilieva, Naumov, 1996; Vennestrom et al., 2008; Korenberg, et al, 2016). Зараженность клещей боррелиями характеризует эпизоотическое состояние природного очага трансмиссивной инфекции и его потенциальную эпидемиологическую опасность. Зараженность во многом определяется процессами горизонтальной передачи боррелий между резервуарными хозяевами и клещами и вертикальной передачи возбудителя по циклу развития клеща (трансовариальная и трансфазовая передачи). Принцип циркуляции боррелий в природных очагах инфекции был детально описан Балашовым (2009), однако возможность эффективной трансвариальной передачи и её значение по-прежнему активно обсуждается (Korenberg et al., 2016). Некоторые авторы отрицают саму возможность трансвариальной передачи (Nakao and Miyamoto, 1994), тогда как другие придают большое значение этому явлению (Балашов и Григорьева 1997). Целью данного исследования было определение особенностей распределения спирохет из группы *B. burgdorferi* s.l. в результате вертикальной передачи возбудителя на протяжении всего жизненного цикла *I. ricinus* в условиях естественных биотопов северо-запада России, и изучение влияния зимовки на выживание боррелий в спонтанно-зараженных клещах. Исследований, изучающих влияние сезонных природных изменений на сохранение и распространение в клещах возбудителей зоонозов, проведено чрезвычайно мало из-за трудоемкости работы (Herrmann et Gern, 2010). Сочетание экологических методов исследований клещей и молекулярной диагностики может представить реальную картину циркуляции и выживания *B. burgdorferi* s.l. в лесном клеще.

Материалом для исследования послужили 13 самок *I. ricinus*, их кладки, личинки, и нимфы, полученные из этих кладок. Взрослые клещи *I. ricinus* были собраны в тот же период из природных биотопов на севере Санкт-Петербурга (Курортный район, N 60 ° 12', E29 ° 42') и Ленинградской области (Выборгский район, N 60 ° 14', E29 ° 36 '). Самок клещей кормили на кроликах, личинок и нимф – на мышцах. Выделение тотальной ДНК проводили из накормленных и отложивших кладки самок *I. ricinus*, их яиц, голодных личинок и нимф – до и после зимовки в естественных условиях в закладках. Для исследования, от каждой особи, из каждой кладки, личиночного и нимфального пула брали небольшое количество материала весом 10-15 мг. До проведения анализа образцы проб хранили в индивидуальных пропиленовых пробирках при температуре -68 °С и ниже. Перед подготовкой к выделению ДНК, клещей промывали в 70 % спирте, подсушивали, затем индивидуально гомогенизировали в 270 µl лизирующего буфера (25mM ЭДТА, 75mM NaCl, 10mM Tris [pH 7,5]) с последующим добавлением 30µl 10% SDS и 10µl раствора протеиназы К (20µg/µl). Выделение ДНК проводилось методом [x. Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Research – 1997, – Т. 25, – N. 22, – С. 4692-4693]. Определение в образцах ДНК *B. burgdorferi* s.l. проводили методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме

реального времени с использованием коммерческого набора «АмплиСенс» (ООО «Интерлабсервис», Россия), рекомендованного ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для выявления *B. burgdorferi* s.l. Амплификацию проводили на термоциклере QuantStudio 3 (Applied Biosystems, США). В ходе исследований, изучающих влияние сезонных изменений погоды на сохранение возбудителя и вертикальную передачу боррелий от фазы к фазе, клещи содержались в многолетних закладках в индивидуальных и групповых садках из мельничного газа в природных биотопах (Grigoryeva, Stanyukovich, 2016).

Положительная реакция на *B. burgdorferi* была отмечена у 6 самок *I. ricinus* (46,2 % от общего числа). Только четыре самки (66,7 % от числа инфицированных) из шести инфицированных (30,8 % от общего числа) лесного клеща передали боррелий в яйца и личинки и 50,0% от числа инфицированных (23,1% от общего числа) – нимфам. Последующее изучение материала, полученного из личинок лесного клеща, не прошедших сезонную диапаузу, показало, что в процессе линек присутствие возбудителя сохранилось во всех четырех линий. В линиях, полученных от самок с порядковыми номерами 4, 6, 11 и 12, ДНК боррелий содержалась в материале полученном, как из кладок, так и из личиночных пуллов, в № 4, 6, 12 нимфальных пуллов. Результаты анализа проб, взятых из этих же пуллов личинок и нимф, прошедших сезонную диапаузу, были отрицательными.

Учитывая полученные данные, можно полагать, что в природных биотопах 2-е инфицированных самок европейского лесного клеща из 3-х могут передавать возбудителя своему потомству через яйца. Из 50% кладок от инфицированных самок выплываются инфицированные личинки. Однако, как показали наши эксперименты, в условиях зимовки у личинок и нимф происходит освобождение от возбудителя. Возможность к последующей трансмиссии возбудителей у клещей возникает только в случае их получения от перезимовавших прокормителей при питании на них в течение следующего после выноса сезона активности. Эти особи после метаморфоза в следующую фазу могут передать возбудителя прокормителям после завершения послеличного доразвития и активизации при последующем питании в сезон выноса до зимовки. Вероятно, в природных очагах ИКБ сохранение возбудителя обеспечивается постоянной циркуляцией между личинками и нимфами и их прокормителями.

Литература

1. Балашов Ю.С. (2009) Паразитизм клещей и насекомых на наземных позвоночных. СПб. «Наука» 357с.
2. Балашов Ю.С., Григорьева Л.А. (1998) Трансовариальная передача боррелий *Borrelia burgdorferi* s.l. таежным клещем *Ixodes persulcatus* (Ixodidae)// Доклады Академии Наук. Т. 363. № 3. С. 422-424.
3. Grigoryeva L.A. & Stanyukovich M.K. (2016) The features of the taiga tick life cycle *Ixodes persulcatus* Sch., (Acari: Ixodinae) in the North-West of Russia. *Experimental & Applied Acarology*, 69, 347-357. <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0038-1>.
4. Herrmann C. & Gern L. (2010) Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) under challenging conditions of temperature and humidity is influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection. *Journal of Medical Entomology*, 47, 1196-1204.
5. Korenberg E.I., Sirotkin M.B. & Kovalevskii Yu.V. (2016) A general scheme of circulation of ixodid tick-borne borreliosis pathogens in the natural foci of Eurasia. *Entomological Review*, 96, 484-499. <https://doi.org/10.1134/S0013873816040126>.
6. Nakao M., Miyamoto K., Fukunaga M. (1994) Lyme disease spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents, and ticks. *J. Infect. Dis.* 170, 4: 878-882.
7. Vennestrøm J., Egholm H. & Jensen P. M. (2008) Occurrence of multiple infections with different *Borrelia burgdorferi* genospecies in Danish *Ixodes ricinus* nymphs. *Parasitology International*, 57, 32-37. <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0093>. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, Грант № 18-04-00075.

