

Влияние вируса клещевого энцефалита на ход метаморфоза напивавшихся личинок и нимф клеща *Ixodes ricinus*

Коротков Ю.С., Буренкова Л.А.

The influencing of the tick-borne encephalitis virus to the process of metamorphosis of engorged larvae and nymphs of the tick *Ixodes ricinus*

Korotkov Yu.S., Burenkova L.A.

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, г. Москва

© Коротков Ю.С., Буренкова Л.А.

В лабораторном опыте смоделированы условия для развития напивавшихся личинок ($n = 2\,500$) и нимф ($n = 800$) *Ixodes ricinus* с диапаузой (6 ч света). В отличие от контрольных (диапауза) клещи, зараженные вирусом клещевого энцефалита (штамм «ЭК-328»), развивались по трем различным сценариям: с диапаузой, с ускорением метаморфоза, без диапаузы. Различия обусловлены сезоном года и действием вируса. Реализация различных сценариев осуществлялась через стимуляцию или блокировку гормона линьки.

Ключевые слова: диапауза, вирус клещевого энцефалита, *Ixodes ricinus*.

In laboratory experience the conditions for development engorged larvae ($n = 2\,500$) and nymphs ($n = 800$) of *Ixodes ricinus* with diapause (6 h of light) are simulated. In contrast to control (diapause), the ticks with tick-borne encephalitis virus (strain EK-328), developed under three variants; namely with diapause, with acceleration metamorphosis, and without diapause. The distinctions are caused by a season of the year and influence of the virus. The realization of variants carries out by stimulation or blocking of moult hormone.

Key words: diapause, tick-borne encephalitis virus, *Ixodes ricinus*.

УДК 616.988.25–002.954.2

Введение

Лесной клещ *Ixodes ricinus* L. является основным переносчиком вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в западной части нозоареала клещевого энцефалита (КЭ). Он служит также удобной лабораторной моделью для исследования паразито-хозяйинных отношений между возбудителями и переносчиками инфекций [2]. По своему поведению *I. ricinus* существенно отличается от другого переносчика ВКЭ — клеща *I. persulcatus*, для которого характерна высокая поисковая активность, наступающая сразу после холодной реактивации. Эта особенность усиливает агрессивность клещей и повышает вероятность их встречи с хозяином в условиях короткого лета. Вместе с тем повышение активности приводит к быстрому расходованию запасных питательных веществ, раннему истощению и гибели *I. persulcatus* в течение 1—2 мес.

Поисковая активность у *I. ricinus* выражена значительно слабее. Подвижность транзитных стадий развития этого клеща повышается только при приближении теплокровного животного — прокормителя. Благодаря такому поведению *I. ricinus* даже после реактивации выживает в лабораторных условиях свыше 2 лет.

Переносчики ВКЭ различаются и по многим другим признакам, характеризующим их физиологическое состояние, которые могут существенным образом влиять на результаты вирусологических экспериментов, увеличивая дисперсию оцениваемых параметров. Обычный набор маркируемых признаков экспериментальных клещей весьма ограничен и включает вид, пол, фазу развития, поколение, место сбора клещей, физиологический возраст (редко).

В настоящей работе исследуются причины, определяющие прочность морфогенетической диапаузы напивавшихся личинок и нимф *I. ricinus* в лабораторных условиях. В качестве одной из причин рассматривается влияние ВКЭ на ход метаморфоза клещей. Возможность такого влияния недавно установлена авторами данной статьи [12], и опыты по его оценке продолжаются по настоящее время.

Материал и методы

Личинки и нимфы получены от самок *I. ricinus*, собранных в природных условиях на северо-востоке Калужской области (Жуковский район, окрестности с. Высокиничи) в 2002—2003 гг. Самок кормили в середине и конце лета на кроликах и взрослых беспородных белых мышах. Всего в опыте использовано 2500 личинок и свыше 800 нимф. Клещи были разбиты на 9 групп, различающихся по фазе развития (личинки, нимфы), наличию ВКЭ (интактные, зараженные), срокам кормления (октябрь, февраль, май), фотопериодическим условиям содержания сытых клещей (либо искусственный длинный день — 18 ч света, либо короткий — 6 ч света). Всех самок и их потомство, вплоть до появления взрослых клещей нового поколения, обследовали на спонтанное и латентное носительство вируса. Голодных личинок и нимф до кормления содержали в течение 1 мес в короткодневных условиях с целью их сенсibilизации и дальнейшей возможности моделировать тип развития клещей, изменяя только фотопериодический режим содержания напивавшихся клещей. Смену фотопериодического режима производили исходя из представлений о короткодневно-длиннодневной фотопериодической реакции (ФПР) лесного клеща [3]. Каждый вариант опыта был представлен тремя группами клещей, в которые брали по 150—300 личинок и 50—100 нимф. Клещей в период их развития содержали при комнатной температуре (22 °С). Ход метаморфоза клещей оценивали по методике, включающей приемы стягивания дисперсионного окна и расчета коэффициентов пробит-регрессии [13].

Клещей заражали путем их кормления на зараженных беспородных белых мышах массой 15—18 г. Мышам вводили внутрибрюшинно по 0,3 мл 4—6 lg БОЕ штамма «ЭК-328», изолированного из клещей *I. persulcatus* в Эстонии. На каждую мышь в день заражения подсаживали по 50—70 личинок или 15—25

нимф. Напивавшихся и перелинявших клещей последующих стадий развития (голодные нимфы и голодные имаго) исследовали на зараженность ВКЭ через 15—30 дней после насыщения или после линьки. Инфицированность клещей определяли в культуре клеток почек эмбриона свиньи по стандартной методике [8].

Результаты и обсуждение

Планирование опыта и оценку полученных результатов проводили с учетом установленных к настоящему времени данных о механизмах диапаузы клещей рода *Ixodes*. Известно, что диапауза напивавшихся личинок и нимф регулируется с помощью нейроэндокринной системы [2]. Диапауза возникает при недостаточном поступлении в гемолимфу клеща гормона линьки. Синдром гормональной недостаточности возникает обычно у клещей, напивавшихся во второй половине лета, в период начавшегося сокращения продолжительности светлой части суток. Существенное влияние на восприятие и оценку световых сигналов оказывает температура [10, 14]. При аномально холодных условиях, которые складываются в отдельные годы в конце весны — начале лета, детерминация диапаузы смещается на более раннее время, календарно совпадающее с периодом летнего солнцестояния или даже с периодом нарастания длины дня. Считывание информации о продолжительности дня осуществляется с помощью так называемого околосуточного осциллятора, представляющего собой эндогенный счетчик продолжительности светлой и темной части суток. Фотопериодическая реакция клещей рода *Ixodes* относится к короткодневно-длиннодневному типу, при котором бездиапаузное развитие возможно только в том случае, если чувствительная стадия воспитывается сначала при коротком дне, а затем попадает в условия длинного дня [3]. При таком типе ФПР индукция диапаузы личинок и нимф *I. ricinus* зависит не только от фотопериодических условий развития напивавшихся клещей, но и от режима освещенности, в котором находились голодные особи. Бездиапаузное развитие клещей даже в условиях длинного дня возможно только после того, как голодные клещи в течение 20 и более суток содержались в короткодневных условиях. Это обстоятельство постоянно учитывалось в ходе опыта. В природной обстановке голодные кле-

щи проходят короткодневную сенсбилизацию осенью. В лабораторных условиях клещей сенсбилизировали искусственно, помещая их за 1 мес до кормления в короткий день.

В условиях длинного дня все напитавшиеся и сенсбилизированные личинки и нимфы развиваются без диапаузы. Вместе с тем наблюдается зависимость продолжительности метаморфоза клещей от срока их насыщения. Особи, напитавшиеся в конце весны, развиваются без задержки. Первые перелинявшие особи появляются на 21—25-й день после кормления. Половина личинок и нимф линяет на 30—32-й и 40—44-й день, а 95% — на 32—35-й и 50—55-й день. Метаморфоз клещей от 15 до 85% протекает за 10—12 дней, т.е. так же, как это отмечается и в природных условиях [13, 14]. Развитие личинок и нимф, напитавшихся в феврале и октябре, задерживается на 25—40 и 16—32 дня соответственно. Темпы их метаморфоза замедляются, а период линьки растягивается на 15—18 и 15—20 дней. Ход линьки интактных и зараженных клещей не различался ни в одной из сезонных серий опыта.

Влияние сезонного фактора на ход метаморфоза проявляется в короткодневных условиях еще более отчетливо, чем в длиннодневных. Интактные и зараженные клещи обеих стадий развития, напитавшиеся в мае, развиваются без задержки. Половина личинок и нимф линяет в следующую стадию развития, так же как и при длиннодневных условиях содержания, на 31—35-й и 40—45-й день. У интактных личинок, напитавшихся в феврале, наблюдается значительная задержка развития. Критическая дата (дата линьки 50% клещей) у личинок приходится на 80—85-й день, что на 50—55 дней позже, чем у личинок, напитавшихся в мае. Линька личинок на нимф продолжается до 105—110 дней. Такую продолжительность метаморфоза можно расценивать либо как задержку развития бездиапаузных клещей, либо как ускорение развития диапаузирующих. Зараженные и интактные личинки, напитавшиеся в октябре, линяют на нимф только после продолжительной диапаузы. Массовое отрождение нимф начинается на 190—200-й день после насыщения личинок.

Интактные нимфы, напитавшиеся в феврале, развиваются с диапаузой, 50% нимф линяют на имаго через 145—150 дней после насыщения, а линька заканчивается через 175—185 дней. Нимфы осеннего питания развиваются также с диапаузой, причем их

диапауза оказывается более прочной, чем у особей, напитавшихся в феврале. Массовая линька нимф на имаго начинается через 215—225 дней после их кормления и заканчивается только через 240—250 дней.

Наличие вируса не отражается на ходе метаморфоза напитавшихся личинок и нимф, содержащихся в условиях длинного дня. В короткодневных условиях наблюдается существенное ускорение развития клещей под действием ВКЭ, но только среди особей, питавшихся в начале астрономической весны. Средний критический период развития личинок и нимф, питавшихся в феврале, сокращается соответственно с 85 до 38 дней (разница 47 дней) и со 145 до 123 дней (22 дня). У личинок при этом наблюдается не только ускорение развития, но и глубокое качественное изменение хода метаморфоза, состоящее в инвертировании диапаузы на бездиапаузное развитие.

Изложенные данные выходят за рамки сложившихся представлений о регуляции скорости развития напитавшихся клещей с помощью одного только суточного осциллятора. При такой регуляции следовало бы ожидать однозначной реакции сенсбилизированных клещей на искусственное увеличение или сокращение длины дня, приводящего либо к бездиапаузному развитию, либо к диапаузе. Зависимость сроков развития от сезона кормления указывает на то, что развитие клещей зависит не только от накопленной информации о длине дня, но и информации о сезоне года. Учитывая условия проведения данного опыта, можно предположить, что такая информация хранится в генетической памяти клеща. Способность различать сезоны года без помощи циркадных ритмов показана для многих видов позвоночных и беспозвоночных животных [19]. Наблюдения за виварной популяцией рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) показали, например, что у этого зверька сохраняется четкая сезонность размножения на протяжении 25 поколений [7].

Анализ паразито-хозяйинных отношений нередко сопряжен со значительными трудностями, возникающими из-за наличия дублирующих систем контроля этих отношений, действующих нередко независимо друг от друга, с различной скоростью и через различные физиологические каналы связи между компонентами. Результаты опыта показывают, что одним из наиболее существенных каналов связи между ВКЭ и переносчиком служит эндокринная система *I. ricinus*,

управляющая ходом метаморфоза напитавшихся личинок и нимф. Наличие вируса ведет, по-видимому, к стимулированию личиночного гормона. В зависимости от фотопериодических условий и сезона года такая стимуляция становится причиной либо сокращения периода покоя, либо полного выхода клещей из диапаузы. В длиннодневных условиях содержания клещей эффект стимуляции личиночного гормона вирусом оказывается замаскированным, поскольку в этом случае длинный день гарантирует бездиапаузное развитие всех напитавшихся клещей независимо от наличия паразита. Возможно, именно то обстоятельство, что в лабораторных исследованиях моделируется обычно бездиапаузное развитие клещей, не позволяло длительное время замечать влияние ВКЭ на скорость их метаморфоза.

Анализ собственных и литературных данных о механизмах формирования морфогенетической диапаузы у клещей рода *Ixodes* позволяет представить регуляторный аппарат их диапаузы в виде механизма, воспринимающего и перерабатывающего внешние сигналы о состоянии окружающей среды. Реализация полученной информации осуществляется на уровне нейроэндокринного управляющего звена, отвечающего за выработку гормона-активатора или гормона-ингибитора у голодных клещей и гормона линьки у напитавшихся клещей. На рисунке показана часть принципиальной схемы такого механизма, работающего в короткодневных условиях.

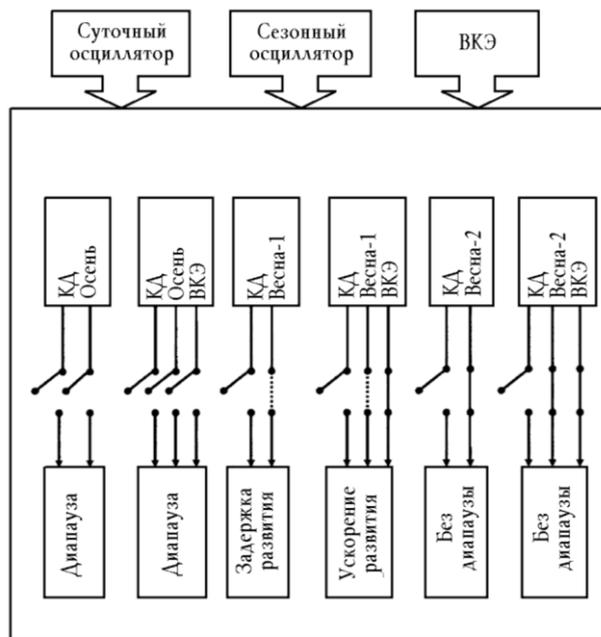


Схема механизма регуляции развития напитавшихся личинок и нимф *Ixodes ricinus* в короткодневных условиях (6 ч света). Суточный осциллятор — счетчик фотопериодических сигналов; сезонный осциллятор — счетчик времен года; ВКЭ — вирус клещевого энцефалита; КД — искусственный короткий день (6 ч света); весна-1 — начало астрономической весны (февраль), весна-2 — конец астрономической весны (май)

Конструкция длиннодневной части схемы не отличается от короткодневной и представляет меньший интерес для целей исследования, поскольку реализация всех внешних воздействий в данном блоке сводится к бездиапаузному развитию клещей.

Среди множества экологических факторов, определяющих состояние активной жизнедеятельности и диапаузы членистоногих, продолжительность дня занимает особое место [6, 13]. В отличие от гигротермических и пищевых условий свет не является необходимым для основных процессов жизнедеятельности иксодовых клещей. Продолжительность дня служит лишь фактором сигнального порядка и позволяет клещам готовиться к неблагоприятным условиям года до их наступления. При сокращении длины дня ниже пороговых значений следует диапауза, которая наступает обычно задолго до осеннего похолодания.

В лабораторных условиях счетчик фотопериодов принудительно устанавливается на длинный или короткий день. Короткий день индуцирует диапаузу, разрывая связь между воспринимающим блоком и блоком — продуцентом гормона линьки. Полученные

данные дают основание предполагать, что работа нейроэндокринной системы *I. ricinus* согласуется с работой биологических часов, имеющих не одну, как предполагалось ранее, а две стрелки, одна из которых указывает длину дня, а другая — сезоны года. Первая и вторая стрелки обозначены на схеме как суточный и сезонный осцилляторы. Сочетание работы этих двух счетчиков времени по включению и выключению соответствующих каналов связи, показанных на схеме (см. рисунок), приводит к определенному типу развития питававшихся интактных клещей. Сезонный осциллятор закрепляет тенденцию к диапаузе в осенний период, тормозит развитие в начале астрономической весны (весна-1) и выступает в роли основного фактора, включающего выработку гормона линьки и приводящего к бездиапаузному развитию клещей в конце весны (весна-2) даже в условиях короткого дня.

В экспериментах, проведенных ранее в полевых условиях, показана существенная роль температуры в модификации фотопериодической реакции клещей [14]. Понижение температуры вызывает увеличение фракции особей, спонтанно формирующих диапаузу в длинном дне, так же как и чрезмерно высокая температура способствует наступлению диапаузы. Изучение степени температурных коррекций ФПР иксодовых клещей в лабораторных условиях не проводилось, но существует необходимость такого исследования, поскольку от этого во многом будет зависеть точность интерпретации вирусологических и паразитологических наблюдений за системой возбудитель — переносчик или паразит — хозяин. В жизни клещей существенное значение имеют не только средние температурные нормы, но и амплитуда суточных терморитмов. Как показано на примере различных видов насекомых, эффекты, возникающие при совместном действии фото- и терморитмов, далеко не всегда соответствуют тем, которые наблюдаются в условиях постоянной температуры, эквивалентной среднесуточным значениям ритмов. Нередко обнаруживаются противоположные тенденции в изменении нормы ФПР в зависимости от температурных значений крио- и термофазы [4].

На ход морфогенеза клещей заметное влияние оказывает ВКЭ, стимулируя при определенном сочетании внешних условий продукцию гормона линьки и ускоряя развитие векторной части популяции переносчика. Такая стимуляция носит специфический характер и отличается от последствий стрессорных воздействий, возни-

кающих после применения сублетальных доз пестицидов, микроволнового излучения, непатогенных для клеща агентов бактериальной природы или вследствие определенного сочетания гигротермических условий содержания клещей [1, 11, 15—17 и др.]. Благодаря специфичности взаимодействия ВКЭ с переносчиками возникает возможность обмена информацией между компонентами системы возбудитель — переносчик. От переносчика возбудитель получает опережающую информацию о предстоящих сезонных изменениях климата, физиологическом состоянии клеща и т.п. Это предоставляет возможность для своевременного перехода вируса в латентное состояние осенью и его активизации весной.

Заключение

Влияние ВКЭ на переносчиков многогранно и является следствием тесной интеграции двух взаимодействующих компонентов паразитарной системы, возникшей в ходе эволюции. Процессы репликации и накопления вируса синхронизированы с процессами питания клещей, переваривания крови, линек, чередованием периодов покоя и активности и т.п. [2]. Как следует из результатов настоящего исследования, ВКЭ использует не только энергетические, но и информационные ресурсы хозяина. Паразитарная система возбудитель — переносчик успешно функционирует на основе хорошо развитой системы обратных информационных связей между взаимодействующими компонентами. Возбудитель получает опережающую информацию о предстоящих сезонных изменениях климата, физиологическом состоянии и ходе онтогенеза клещей, что позволяет ему адекватно реагировать на эти изменения чередованием периодов покоя, активности и размножения.

В свете проведенных исследований о влиянии возбудителя на переносчика находят объяснение и полученные ранее данные о спонтанном размножении вируса в питававшихся природных нимфах *I. persulcatus* с детерминированной диапаузой [9]. Тогда ежегодно на протяжении четырех лет (1988—1991) наблюдали многократное увеличение вирусозности нимф, питававшихся во второй половине лета. Оказалось, что в ходе трансфазовой передачи ВКЭ диапауза выступает в роли амплификатора, а не супрессора размножения вируса, как считали ранее [5]. В результате вклад диапаузирующих клещей в циркуляцию

вируса не уступает вкладу клещей, проходящих бездиапаузное развитие.

Сокращение продолжительности развития клещей под действием ВКЭ экологически выгодно для популяции возбудителя, поскольку это ведет к увеличению векторной части популяции переносчиков, повышает вероятность вертикальной и горизонтальной передачи возбудителя и его длительной циркуляции в очагах КЭ. Такое взаимодействие сформировалось, по видимому, в ходе совместной эволюции хозяина и паразита и закрепилось естественным отбором.

Установленные закономерности указывают на необходимость дополнения регламента вирусологических исследований, оценивающих интенсивность вертикальной (трансфазовой) передачи ВКЭ, данными о фотопериодических условиях содержания экспериментальных партий клещей. Такой подход позволяет сократить неспецифическую дисперсию результатов эксперимента за счет дополнительной группировки клещей по признаку детерминированности и прочности диапаузы.

Литература

1. Алексеев А.Н. Система клещ — возбудитель и ее эмерджентные свойства. СПб.: Наука, 1993. 203 с.
2. Балашов Ю.С. Иксодовые клещи — паразиты и переносчики инфекций. СПб.: Наука, 1998. 287 с.
3. Белозеров В.Н. К характеристике параметров двухступенчатой фотопериодической реакции, регулирующей сезонное развитие нимф клеща *Ixodes ricinus* (Acarina: Ixodidae) // Паразитология. 1995. Т. 29. Вып. 4. С. 240—249.
4. Волкович Т.А. Влияние постоянных и переменных температур на индукцию диапаузы у златоглазки *Chrysopa phyllochrota* Wesm. (Neuroptera, Chrysopidae) // Энтомолог. обозрение. 1997. Т. 76. № 2. С. 241—250.
5. Вотяков В.И., Злобин В.И., Мишаева Н.П. Клещевые энцефалиты Евразии. Вопросы экологии, молекулярной эпидемиологии, нозологии, эволюции. Новосибирск: Наука, 2002. 438 с.
6. Данилевский А.С. Система экологических адаптаций насекомых к сезонности климата // Проблемы фотопериодизма и диапаузы у насекомых. Л., 1972. С. 15—25.
7. Демина В.Т., Бернштейн А.Д., Коротков Ю.С. Сравнительный анализ репродуктивного процесса у рыжих полевков в природе и в лабораторной колонии // Бюл. МОИП. 1997. Т. 102. Вып. 6. С. 11—19.
8. Дживанян Т.И., Королев М.Б., Карганова Г.Г. и др. Изменение зависимых от хозяина характеристик вируса клещевого энцефалита при его адаптации к белым мышам // Вопр. вирусологии. 1988. № 5. С. 589—595.
9. Кисленко Г.С., Коротков Ю.С., Чунихин С.П. Мелкие млекопитающие в природных очагах клещевого энцефалита средней Сибири // Мед. паразитология. 1995. № 1. С. 36—40.
10. Коротков Ю.С. Постепенная изменчивость паразитарной системы клещевого энцефалита // Вопр. вирусологии. 2005. Т. 50. № 3. С. 52—56.
11. Коротков Ю.С., Буренков М.С., Буренкова Л.А. и др. Реакция клеща *Hyalomma asiaticum* (Acarina, Ixodidae) на микроволны 1—4 ГГц // Мед. паразитология. 1996. № 4. С. 18—21.
12. Коротков Ю.С., Буренкова Л.А. Влияние вируса клещевого энцефалита на скорость развития сытых личинок клеща *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) // Материалы VIII Всерос. акарологического совещания. СПб., 2004. С. 52—54.
13. Коротков Ю.С., Кисленко Г.С. Морфогенетическая диапauза таежного клеща и методы ее количественной оценки в условиях полевого эксперимента // Паразитология. 1991. Т. 25. Вып. 6. С. 494—503.
14. Коротков Ю.С., Кисленко Г.С. Соотношение светового и гигротермического факторов в детерминации морфогенетической диапauзы личинок и нимф таежного клеща на северо-западных отрогах Восточного Саяна // Паразитология. 1995. Т. 29. № 3. С. 145—153.
15. Коротков Ю.С., Кисленко Г.С., Чунихин С.П. и др. Некоторые особенности акарицидного действия кропотекса — ингибитора развития клещей // Мед. паразитология. 1985. № 3. С. 44—48.
16. Alekseev A.N., Korotkov Y.S., Burenkova L.A. Virus-Pesticide interaction in *Ixodes persulcatus* and *Amblioma herbraeum* tick (Acarina, Ixodidae) // Experimental & Applied Acarology. 1997. P. 561—568.
17. Cisak E., Chimielewska-Badora J., Dutkiewicz J., Zwolinski J. Preliminary studies on the relationship between *Ixodes ricinus* activity and tick-borne infection among occupationally-exposed inhabitants of Eastern Poland // Ann. Agric. Environ. Med. 2001. V. 8. P. 293—295.
18. Perret J.L., Guerin P.M., Diehl P.F., et al. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus* // J. of Experimental biology. 2003. V. 206. P. 1809—1815.
19. Saunders D.S. Insect photoperiodism — the clock and counter: a revive // J. Insect. Physiol. 1981. V. 6. P. 99—115.

Поступила в редакцию 06.01.2006 г.