

РАДИОИЗОТОПНОЕ МЕЧЕНИЕ КЛЕЩЕЙ
IXODES PERSULCATUS

А. А. Лурье, Р. Л. Наумов и Е. А. Арумова

Институт медицинской паразитологии и тропической медицины
им. Е. И. Марциновского МЗ СССР, Москва

Испытаны два метода радиоактивного мечения клещей *Ixodes persulcatus*: 1) для получения меченых голодных личинок напивавшимся самкам вводили субкутикулярно глюкозу — 1.6-С¹⁴; 2) личинок и нимф кормили на мышах, которым вводили внутрибрюшинно глицин-1-С¹⁴ или глицин-2-С¹⁴. Вторым методом казался более эффективным, причем лучшие результаты получены с глицином-2-С¹⁴.

Исследования последних лет показали, что эпизоотический процесс в очагах клещевого энцефалита представляет собой весьма сложное явление, которое, как правило, не удается охарактеризовать простыми связями. Отсюда неудачи ряда авторов, пытавшихся вывести зависимость зараженности клещей вирусом или заболеваемости населения от обилия и характера размножения зверьков, уровня их иммунитета и т. д. Одна из причин несоответствия этих показателей кроется в гетерогенности популяции клещей (Наумов и др., в печати). Популяция взрослых клещей состоит из особей трех генераций, каждая из которых имеет собственную историю развития и отличные связи с вирусом. В разные годы соотношение генераций может меняться, приводя к изменению эпизоотической ситуации в очаге.

Немногочисленные попытки определить возрастной состав популяции таежных клещей привели к выяснению лишь физиологического возраста паразитов. Единственным пока методом, который может дать ответ на вопрос о возрастном составе популяции клещей, служит метод длительного, в течение нескольких лет наблюдения за развитием меченых клещей в природе. В 1969 г. такой опыт был заложен нами в Западном Саяне. Но сначала нужно было отработать метод маркировки клещей на длительное время — радиоизотопное мечение.

Известны два основных метода радиоизотопного мечения клещей. Первый предложен Зоненшайном (Sonenshine, 1968; Sonenshine and Yunker, 1968). Он заключается во введении самкам перед яйцекладкой глюкозы или глицина, меченных С¹⁴. Метод Зоненшайна привлекателен своей высокой производительностью (по числу меченых личинок), экономичностью и малыми затратами труда. Метка у *Dermacentor variabilis* сохранялась в течение 8 мес.

Другой метод — мечение личинок и нимф путем кормления их на лабораторных животных, которым вводят радиоактивные вещества. Он давал сравнительно хорошие результаты при мечении нимф (Бабенко, 1960; Самострельский и Дайтер, 1966), однако личинок с достаточно высокой активностью получить не удавалось (Бабенко, 1960).¹

¹ Некоторые исследователи применяли еще один метод маркировки клещей посредством кратковременного их погружения в радиоактивный раствор (Knapp et al., 1956; Quan et al., 1957; Smittle et al., 1967). Сохраняется такая поверхностная метка только до первой линьки. Для наших целей этот метод, естественно, непригоден.

Перед нами стояла задача пометить клещей на длительное время, желательно на срок до 5 лет, учитывая время жизни клещей этого вида — 3—5 лет в зависимости от сроков питания и условий развития.

Трансовариальный метод Зоненшайна, против ожидания, оказался технически трудновыполнимым и, кроме того, не обеспечивал достаточно высокой радиоактивности у меченых личинок (для обнаружения метки у маркированных таким способом личинок приходится применять стационарные измерительные установки или метод радиоавтографии).

Накормленным на кроликах или собаках самкам *Ixodes persulcatus* вводили субкутикулярно раствор глюкозы- 1.6-C^{14} с активностью около 25 мкюри на одну самку (по данным Зоненшайна, это максимальное количество C^{14} для *D. variabilis*, так как при более высоких дозах значительно снижается выход личинок из яиц; то же оказалось и для *I. persulcatus*). Радиоактивный раствор готовили на стерильном физиологическом растворе, удельная активность глюкозы была 7.3 мкюри/г. Объем раствора для одной инъекции — 0.0063 мл, диаметр иглы шприца — 0.4 мм (шприц для газовой хроматографии на 10 мкл производства ОКБА).

Из-за высокого давления в полости тела напитавшейся самки сразу же по вынимании иглы внутриполостная жидкость начинает медленно выдавливаться через отверстие. Чтобы предотвратить вытекание, были сделаны попытки заклеймить отверстие в кутикуле клеем, приготовленным из пенопласта (раствор в хлороформе), однако заклеивание не всегда было достаточно надежным и быстрым и не исключало возможности значительных потерь глюкозы C^{14} . Надо сказать, что и сам автор метода приводит высокие цифры потерь радиоактивности при введении от 24 до 70 (85)%, в среднем около 65%.

В наших опытах было использовано 12 самок *I. persulcatus*, которые через 6—7 дней начали давать радиоактивные яйцекладки. В течение 16—20 дней самки дали по 1500—2300 (в среднем около 1900) яиц с радиоактивностью в естественном виде в пределах 0.2—2.2 имп./сек. и при раздавливании — 0.8—7.2 имп./сек. в расчете на 1 яйцо. Измерения выполняли на интенсиметре Луч-А с торцовым счетчиком СБТ-7 (3 мг/см²).

Примерно через месяц из яиц начали выходить личинки. Число вышедших личинок от разных самок было неодинаково — от 5 до 74% от общего числа яиц. Это отношение зависит, по-видимому, от количества радиоуглерода, проникшего в яйца [наибольшая активность (не ниже 20 имп./мин.) была зарегистрирована у потомства от тех самок, которые дали наименьший выход личинок из яиц (всего 5—6%)].

Как и по наблюдениям Зоненшайна, активность яиц и личинок в наших опытах показала зависимость от дня яйцекладки: активность максимальна у яиц, отложенных в первый день, затем снижается и вновь возрастает у яиц, откладываемых в последние дни. Измерения активности личинок через 70—80 дней после вылупления дали такую же кривую с минимумом (рис. 1), но возрастание радиоактивности к концу яйцекладки проявляется еще более четко. Зоненшайн на клещах *Dermacentor* не наблюдал возрастания радиоактивности в последних партиях яиц, в связи с чем он рекомендовал отбрасывать яйца последних дней яйцекладки как малоактивные. Особенности *Ixodes persulcatus* позволяют использовать яйца, отложенные не только в первые несколько дней, но и в последующие дни и, таким образом, повысить число используемых меченых личинок при тех же затратах радиоизотопа.

Большая часть самок, которым была введена глюкоза C^{14} в количестве 25 мкюри, дала яйца с выходом личинок в 40—75%, смертность же личинок в течение первых 70—80 дней при содержании в камере дифференцированной влажности составила 9—25%. На 70—80-й день личинки имели активность от 4 до 20 и редко до 30—60 имп./мин. (измерения на радиометрической установке Б-2 с торцовым счетчиком Т-25-БФЛ, 1.7 мг/см², с расстояния 16 мм от окна счетчика).

Радиоактивность раздавленных личинок, измеряемая с помощью интенсиметра Луч-А, была примерно в 3 раза выше: от 0.2 до максимально

3—4 имп./сек. в расчете на 1 личинку. Для того чтобы обнаружить радиоактивную метку у отдельной личинки, нужно, чтобы ее радиоактивность была выше 1—2 имп./сек. (определяемый минимум на полевых приборах типа Луч-А, ИМА и т. д.). Поэтому в данном случае надежных результатов с помощью полевого радиометра получить нельзя и приходится применять другие методы обнаружения радиоактивности, которые хотя и более чувствительны, но значительно осложняют полевую работу.

Второй метод мечения позволяет получить меченых напитавшихся личинок и нимф посредством кормления их на лабораторных животных, которым предварительно введено радиоактивное вещество. В качестве донора радиоактивной крови удобнее всего использовать белых мышей, благодаря сравнительно малому расходу дорогостоящих радиоактивных

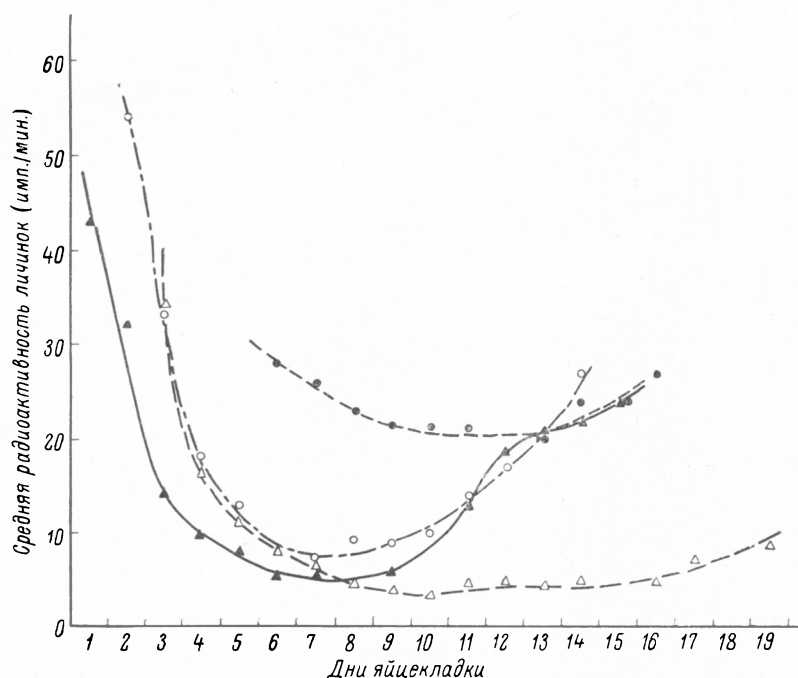


Рис. 1. Радиоактивность личинок в зависимости от дня яйцекладки (личинки от 4 самок).

препаратов, большому числу клещей, которых можно накормить на одной мыши, удобству работы с этим объектом и, наконец, относительно высокой радиорезистентности белых мышей по сравнению с другими лабораторными животными.

Применявшая ранее этот метод Бабенко (1960) утверждала, что максимально переносимое количество C^{14} для мышей не превышает 6 мккюри/г (около 180 мккюри на 1 животное). В то же время Новокрещенова и другие (1961) отмечали, что введение мышам до 500 мккюри глицина C^{14} (для мечения блох грызунов) не вызывало заметных изменений жизнедеятельности мышей. По-видимому, поражение мышей в опытах Бабенко было вызвано не воздействием радиации, а какими-то побочными явлениями. Мы вводили белым мышам внутрибрюшинно до 500 мккюри глицина C^{14} (до 17—20,5 мккюри/г) и также не наблюдали заметных клинических признаков радиационного поражения. Лишь в тех случаях, когда на мышь весом около 25 г высаживали одновременно более 400—500 личинок, животные погибали с признаками анемии, по-видимому, токсического происхождения.

В ряде предшествующих работ для введения животным применялся глицин- C^{14} . Используемый в процессе метаболизма в первую очередь на построение белков, глицин, безусловно, удачный субстрат для мечения

на продолжительное время, так как биологическое обновление структурных белков у клещей с невысокой общей интенсивностью обмена веществ происходит сравнительно медленно. Однако в отличие от предыдущих работ мы сочли целесообразным вводить мышам не глицин-1- C^{14} (метка в карбоксильной группе), а глицин-2- C^{14} (метка в карбонильной группе), так как из-за потерь C^{14} в результате декарбоксилирования (возможно, еще до включения C^{14} глицина в компоненты крови мышей) эффективность мечения с помощью глицина-1- C^{14} может быть ниже, чем в случае исходной метки по карбонильному атому.

Радиоактивный глицин с удельной активностью 13—19 мккюри/г на физиологическом растворе без добавления глицина-носителя вводили

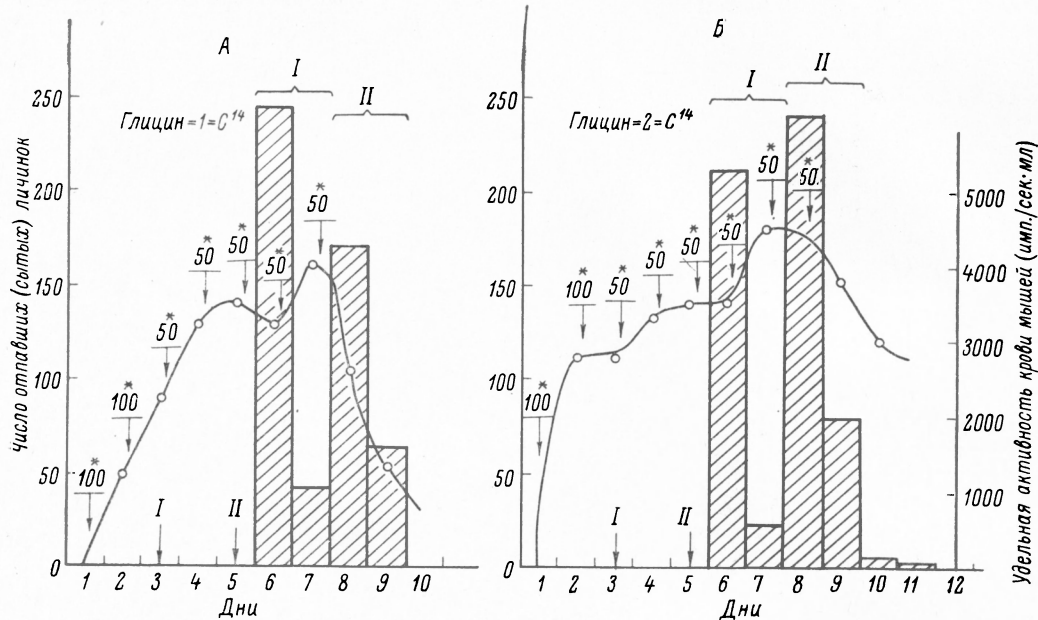


Рис. 2. Радиоактивность крови мышей и график подсаживания и отпадения личинок клещей.

А — мышь № 4; Б — мышь № 6; I и II — порядковые номера партий личинок; звездочками указаны дозировки инъекций мышам радиоактивного глицина (в мккюри).

белым мышам внутрибрюшинно в объеме 0.1—0.2 мл. Личинок и нимф подсаживали на мышей с воротничками по известному способу. Для контроля радиоактивности ежедневно из хвоста брали пробы по 0.01 мл крови. Вес мышей был в пределах 23.5—29 г, в среднем около 25 г. Всего в опыте было 10 мышей, на которых помечено более 4000 личинок и около 300 нимф. Большая часть меченых клещей использована для полевого эксперимента, а около 150 личинок и 30 нимф оставлены в лаборатории для наблюдения за изменением радиоактивности.

Чтобы получить возможно больший выход личинок с максимальной радиоактивностью, введение мышам меченого глицина производили в несколько приемов: в первые 2 дня по 100 мккюри, а в последующие дни (для поддержания радиоактивности крови на приблизительно постоянном уровне) по 50 мккюри ежедневно. Как мы и предполагали, оказалось, что C^{14} включается в кровь мышей из глицина-2- C^{14} в несколько раз быстрее, чем из глицина-1- C^{14} (рис. 2). Так, например, на следующий день после внутрибрюшинного введения в мышей 100 мккюри глицина-2- C^{14} удельная активность крови составляла 2800—3300 имп./сек.·мл, а при введении такой же дозы глицина-1- C^{14} —только 500—1400 имп./сек.·мл. Активность меченых личинок также оказалась выше при использовании глицина-2- C^{14} .

Наблюдения за изменением активности крови мышей показали, что при использовании для инъекций глицина-2- C^{14} первую партию ли-

личинки можно подсаживать на мышей одновременно с первой инъекцией. В случае применения глицина-1-С¹⁴ нарастание активности крови происходит значительно медленнее (рис. 2), в связи с чем целесообразно подсаживать личинок лишь на третий день после первой инъекции.

Массовое отпадение сытых личинок происходит на четвертый и в меньшей мере на пятый день кормления (рис. 2). Для уплотнения времени и экономии препарата можно через 2 дня после первой (I) подсадки личинок, еще до начала их отпадения, подсадить вторую (II) партию личинок. В последующие за этим два дня отпадает большая часть личинок I партии, а затем еще два дня будут отпадать личинки II партии.

Подсаживать личинок каждый раз нужно в количестве не более 250—300 особей на мышь, весом около 30 г. Это гарантирует получение около 500—600 личинок уже в первые два сбора. Если мыши будут выглядеть хорошо, а пробы крови не покажут анемии, использование таких мышей целесообразно продолжить, повторяя инъекции радиоактивного глицина и подсаживание новых партий личинок. Общий расход меченого глицина составит для первых двух сборов 350—400 мккюри и для последующих двух сборов — дополнительно 200—250 мккюри. Общий график инъекций, подсаживания и сбора личинок, исходя из сказанного выше, представлен в таблице. При составлении графика учитывалось также, что наибольшее количество крови личинки выпивают на вторые и особенно на третьи сутки питания. График инъекций составлен таким образом, чтобы активность крови мышей становилась наибольшей именно к этим дням.

График работ при мечении личинок *Ixodes persulcatus* на мышах, которым вводится радиоактивный глицин

Дни	Глицин-1-С ¹⁴			Глицин-2-С ¹⁴		
	инъекции глицина (в мккюри)	подсадка личинок, № партии	сбор личинок, № партии	инъекции глицина (в мккюри)	подсадка личинок, № партии	сбор личинок, № партии
1	100	—	—	100	I	—
2	100	—	—	100	—	—
3	50	I	—	50	II	—
4	50	—	—	50	—	I
5	50	II	—	50	—	I
6	50	—	I	—	—	II
7	—	—	I	—	—	II
8	—	—	II	—	—	—
9	50	—	II	50	III	—
				50	—	—
10	50	III	—	50	IV	—
11	50	—	—	50	—	III
12	50	IV	—	50	—	III
13	—	—	III	—	—	IV
14	—	—	III	—	—	IV
15	—	—	IV	—	—	—
16	—	—	IV	—	—	—

График кормления нимф с целью мечения принципиально не отличается от графика для личинок. Но, поскольку нимфы выпивают значительно больше крови, для их мечения не нужно добиваться максимально высоких показателей активности крови мышей. Это обстоятельство позволяет получить две или даже более партий меченых нимф на мыши, уже накормившей две партии личинок, причем без дополнительных инъекций глицина. После прекращения инъекции радиоактивность крови мышей еще долгое время остается на сравнительно высоком уровне. Так, во время инъекций четырем мышам глицина-2-С¹⁴ активность крови поддерживалась в среднем на уровне 6000—7000 имп./мин.·мл, а через 7 дней после последней инъекции активность снизилась примерно на половину (рис. 3). За один прием следует подсаживать на мышь не более 30 нимф.

В опытах с использованием обеих форм глицина были получены меченые личинки и нимфы с радиоактивностью, которая вполне может быть зарегистрирована с помощью полевого интенсиметра типа Луч-А. Живые личинки в день отпадения имели активность от 0.5 до 1.1 имп./сек., а раз-

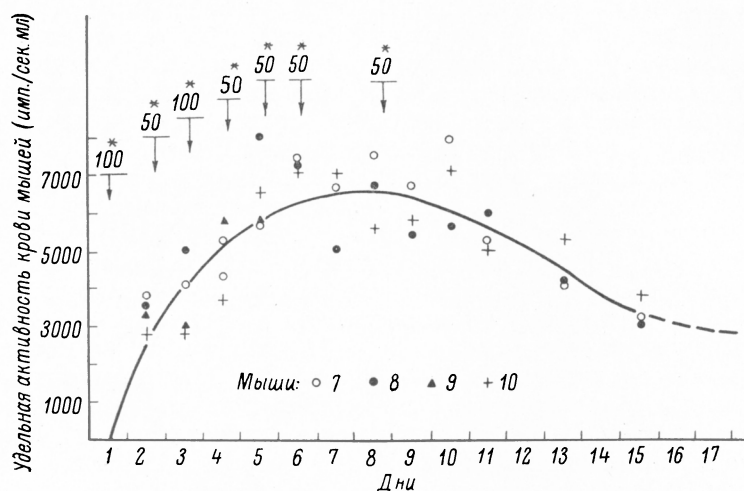


Рис. 3. Изменение радиоактивности крови мышей в результате инъекций глицина-2-С¹⁴; звездочками указаны дозировки инъекций мышам радиоактивного глицина (в мккюри).

давленные на предметном стекле — от 4 до 10 имп./сек. Активность нимф была намного выше, чем личинок.

В дальнейшем радиоактивность живых меченых личинок и нимф измеряли в лабораторных условиях на радиометрической установке типа Б-2 с торцовым счетчиком Т-25-БФЛ (1.7 мг/см²), с расстояния 16 мм

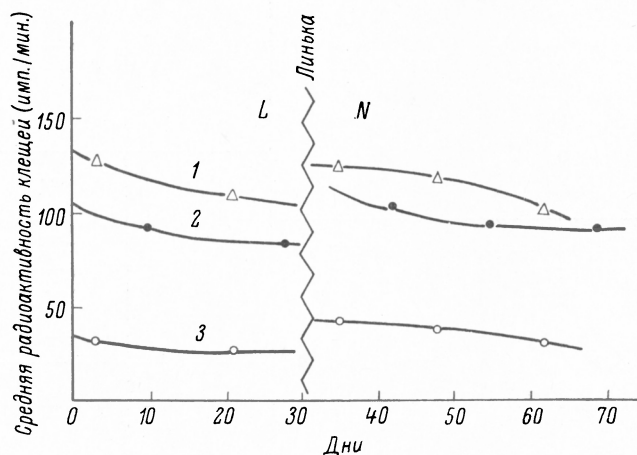


Рис. 4. Изменение во времени радиоактивности меченых личинок.

1 — личинки, меченные глицином-2-С¹⁴ (около 100 личинок);
2 и 3 — личинки, меченные глицином-1-С¹⁴ (24 и 40 личинок).

от окна счетчика. Радиоактивность личинок и вышедших из них нимф (рис. 4) снижается до и после линьки, но в очень небольшой степени. Непосредственно после линьки измеряемая активность нимф оказывается выше, чем у предшествующих им личинок. Измеряемая активность меченых напивавшихся нимф (рис. 5) со временем несколько возрастала. У взрослых клещей активность (в среднем для самцов и самок) была несколько выше, чем у нимф перед линькой. Причины увеличения реги-

стрируемой радиоактивности после линьки кроются, вероятнее всего, в относительном накоплении C^{14} в новой кутикуле клещей (следует учитывать, что мягкое β -излучение C^{14} сильно поглощается в веществе и поэтому счетчик Гейгера-Мюллера регистрирует C^{14} в сущности только с поверхности тела клещей). В последующем взрослые клещи показали

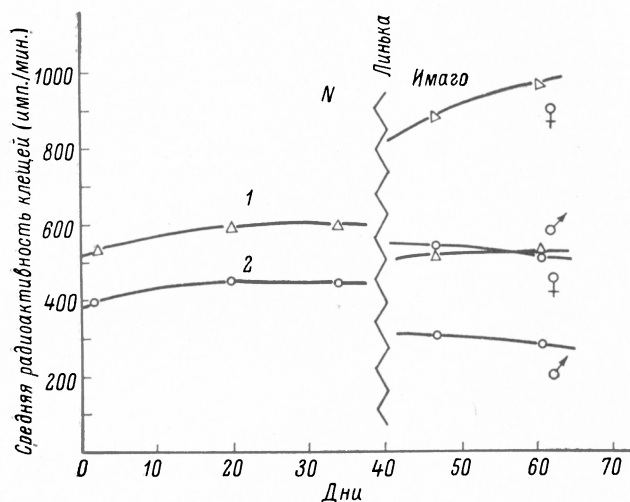


Рис. 5. Изменение во времени радиоактивности меченых нимф.

1 — нимфы, меченные глицином-2- C^{14} (10 нимф); 2 — нимфы, меченные глицином-1- C^{14} (18 нимф).

или очень небольшой спад радиоактивности со временем (если для метки использовался глицин-1- C^{14}) или даже некоторое возрастание измеряемой активности (если для метки использовался глицин-2- C^{14}). Нарастание измеряемой радиоактивности нимф и взрослых клещей может быть обусловлено перераспределением C^{14} внутри тела клещей (в основном в направлении к кутикуле) или возрастанием площади тела.

Таким образом, метод мечения клещей посредством кормления личинок или нимф на мышах, которым вводится глицин- C^{14} , позволяет получить длительно сохраняемую метку с достаточно высокой радиоактивностью, которую легко проследить на протяжении фаз развития клещей.

Л и т е р а т у р а

- Б а б е н к о Л. В. 1960. Применение радиоактивных изотопов для мечения клещей. Мед. паразитол. и паразитарн. бол., 29 (3) : 320—324.
- Н а у м о в Р. Л., Р у б и н а М. А., Л е б е д е в а Н. Н. и Р ж а х о в а О. Е. Мелкие млекопитающие и клещи *Ixodes persulcatus* в очаге клещевого энцефалита в Западном Саяне. XIII Межд. энтомот. конгресс, тез. докл., М.
- Н о в о к р е щ е н о в а Н. С., С о л д а т к и н Н. С., Д е н и с е н к о Л. К. и М а р т е н с Л. А. 1961. Применение радиоактивного углерода для мечения блох. Мед. паразитол. и паразитарн. бол., 30 (1) : 72—76.
- С а м о с т р е л ь с к и й А. Ю. и Д а й т е р А. Б. 1966. Опыт применения радиоактивных изотопов для метки клещей *Ornithodoros papillipes*. Тр. инст. эпидемиол. и микробиол. им. Пастера, 29 : 86—89.
- К н а р р S. E., F a r i п а с с и C. J., H e r b e r t C. M. and S a e n g e r E. L. 1956. A method of labeling the lone star tick (*Ambliomma americanum*) with a radioactive indicator (P^{32}). J. Econ. Entomol., 49 (3) : 393—395.
- Q u a n S. F., H a r t w e l l W. V., S c o t t K. G. and P e n g C. T. 1957. Cerium 144 as a tag for arthropods of medical importance. Trans. Royal Soc. Trop. Med., Hyg., 51 (1) : 87—88.
- S m i t t l e B. J., H i l l S. O. and P h i l i p s F. M. 1967. Migration and dispersal patterns of Fe^{59} labeled lone star ticks. J. Econ. Entomol., 60 (5) : 1029—1031.
- S o n e n s h i n e D. E. 1968. Radioisotopes in studies on the ecology of ticks vector of disease. In: Isotopes and radiation in entomology. IAEA, Vienna : 31—52.
- S o n e n s h i n e D. E. and Y u n k e r C. E. 1968. Radiobiology of tick progeny by inoculation of procreant females. J. Econ. Entomol., 61 (6) : 1612—1617.

RADIOACTIVE TRACING OF TICKS IXODES PERSULCATUS

A. A. Lurje, R. L. Naumov and E. A. Arumova

S U M M A R Y

Two methods of radioactive tracing of ticks were employed. In order to obtain traced unfed larvae engorged females were inoculated subcuticularly with 25 mkCu glucose — 1.6 C¹⁴ in saline. The larval activity was from 4 to 20 and seldom from 30 to 60 imp./min.

The second method yielded better results. Larvae and nymphs were traced by their feeding on white mice which were inoculated intraperitoneally with glycine-1-C¹⁴ or glycine-2-C¹⁴ in saline (50 and 100 mr Cu/day).

The total dose amounted to 500 mkCu. The activity of living engorged larvae was 0.5 to 1.1 imp./sec. and that of cryshed ones — 4 to 10 imp./sec. The activity of nymphs was much higher. The best results were obtained with glycine-2-C¹⁴.
