

СОДЕРЖАНИЕ

Том 55, № 1, 2021

Professor Yuri Sergeevich Balashov: legacy of an outstanding parasitologist <i>Korenberg E. I., Kahl O.</i>	3
Роль антимикробных пептидов в иммунитете паразитических пиявок (Annelida, Hirudinea) <i>Кайгородова И. А.</i>	12
Молекулярная диагностика тейлериоза крупного рогатого скота <i>Бурсаков С. А.</i>	32
Различие в распределении зимующих самок кровососущих комаров из родов <i>Culex</i> и <i>Culiseta</i> (Diptera, Culicidae) в привходовых частях пещер: связь с разными требованиями к температуре и влажности воздуха <i>Разыграев А. В.</i>	48
К особенностям развития куколочной фазы слепней (Diptera, Tabanidae) Северо-Запада России <i>Агасой В. В.</i>	63
Ultrastructure of the metacestode <i>Aploparaksis shigini</i> Bondarenko et Kontrimavichus, 2006 (Cestoda: Aploparaksidae) <i>Pospekhova N. A., Regel K. V</i>	73
Журнал «Паразитология». Правила для авторов (обновление, 2021 г.)	81

CONTENTS

Vol. 55, No. 1, 2021

Professor Yuri Sergeevich Balashov: legacy of an outstanding parasitologist <i>Korenberg E. I., Kahl O.</i>	3
The role of antimicrobial peptides in the immunity of parasitic leeches (Annelida, Hirudinea) <i>Kaygorodova I. A.</i>	12
Molecular diagnostics of cattle theileriosis <i>Bursakov S. A.</i>	32
Difference in the distribution of overwintering female mosquitoes of the genera <i>Culex</i> and <i>Culiseta</i> (Diptera, Culicidae) in near-entrance parts of caves in relation to air temperature and humidity <i>Razygraev A. V.</i>	48
To the peculiarities of the development of horsefly pupal phase (Diptera, Tabanidae) in Northwest Russia <i>Agasoi V. V.</i>	63
Ultrastructure of the metacestode <i>Aploparaksis shigini</i> Bondarenko et Kontrimavichus, 2006 (Cestoda: Aploparaksidae) <i>Pospekhova N. A., Regel K. V.</i>	73
Journal "Parazitologiya". Guide for authors (update, 2021)	81

УДК 576.895

**PROFESSOR YURI SERGEEVICH BALASHOV:
LEGACY OF AN OUTSTANDING PARASITOLOGIST**

© 2021 E. I. Korenberg^{a,*}, O. Kahl^b

^aGamaleya National Centre for Epidemiology and Microbiology,
Moscow, 123098 Russia

^bTick-radar GmbH, 10555 Berlin, Germany

*e-mail: edkorenberg@yandex.ru

Received 16.10.2020

Received in revised form 30.10.2020

Accepted 02.11.2020

This paper is devoted to the contributions of the outstanding parasitologist Yuri S. Balashov. It is not biographical. Its purpose is to highlight selected aspects of Yuri S. Balashov's scientific legacy that the authors consider most important for an international readership. This should direct the attention of international researchers to his various scientific theses and concepts, some of which have been only published in Russian language, and should also open up a broader discussion. The scope of Balashov's scientific interests was remarkable, although he devoted special attention to the research of argasid and ixodid ticks (Argasidae and Ixodidae). The main results and conclusions of his tremendous work have been described here using mainly his own words. Only some explanations that may be required to increase the reader's understanding of the concepts, terms and thoughts of Yu. Balashov were made by the authors.

Keywords: parasitology, medical entomology, ecology, Argasidae, Ixodidae, ticks, natural foci

DOI: 10.31857/S0031184721010014

The life of Yuri Sergeevich Balashov (1931–2012), an outstanding parasitologist, has been described in special publications (Filippova, 2013; Medvedev, 2012; Medvedev et al., 2013). This paper is not biographical. Its purpose is to highlight the aspects of Balashov's scientific legacy that we consider most important. The scope of his scientific interests was remarkably broad, although he devoted special attention to the research of argasid and ixodid ticks (Argasidae and Ixodidae). Balashov was a prominent representative of the parasitology school founded by the Academician Yevgeny N. Pavlovsky, who developed the theory of natural focality of transmissible diseases (Pavlovsky, 1939; 1966) and whose ideas he expounded and further developed (Balashov, 1967; 1984a; 2003; Balashov et al., 1968). He greatly appreciated the biocenological and comparative parasitological concepts by Vladimir N. Beklemishev (1970) about parasitic systems and the life schemes of species, which he considered to be of high significance for the development of parasitology. This follows from Balashov's paper (1991) commemorating the centennial of Beklemishev's birth, where he expressed an idea that may stand for his "scientific signature" and serves as an epigraph

to all his scientific activities: “It would be advantageous for parasitology to further develop the universal concept of parasitic systems that reflects the unity of all parasitic organisms as an ecological category. This concept stimulates the exchange of ideas between traditional parasitology and microbiology and creates prerequisites for developing our knowledge of the general principles of parasitism as a form of existence of living organisms” (Balashov, 1991, p. 189). It is in the light of such a broad general parasitological concept that Balashov analyzed crucial problems of medical entomology, the scientific branch treating medically significant arthropods, including the parasite–host relationships of arthropods and terrestrial vertebrates. He authored more than 200 scientific papers and several monographs (Balashov, 1967; 1972a; 1979; 1982; 1983; 1998; 2009). The publication of each of his books was a major event in parasitology, and many of them are quite comprehensive and have been milestones. However, it is the reading of these publications in a continuous chronological sequence that gives a holistic impression of Balashov’s scientific legacy, demonstrating long-term consistency in his progression from particular studies to multifaceted generalizations in evolutionary parasitology. He did not abandon a given problem after addressing another one. They remained within the scope of his interests, and their range was growing broader and more complex over time. Here we attempt to recapitulate the results of this process, which in itself is fairly instructive, especially for young researchers working in an era where we emphasize research on the molecular and genetic level and less on the function of whole organisms, populations and ecosystems. The main results and conclusions of Balashov’s tremendous work will be described here using mainly his own words. Any explanatory remarks or comments will be avoided where possible since they appear inappropriate in this context, although some of Balashov’s views and postulates are obviously open to debate (Korenberg, 1999; 2010). Explanations that may be required to increase the reader’s understanding of the concepts, terms and thoughts of Yu. Balashov will be made by the authors in footnotes or in square brackets.

Biology and physiology of ticks

In the 1950s, Balashov initiated studies on elementary features of the biology and physiology of ixodid ticks (poorly known at that time), which was the basis for all his future research. The scope of the problems he addressed included the structure of tick mouthparts; the process of bloodsucking and changes in the integument during this process; the functions of dermal glands and adaptations to consuming large volumes of blood; the tick life cycle and changes in tick body weight in the course of bloodsucking and daily rhythmicity of tick detachment from the host after feeding; the structure of digestive organs as related to the process of digestion; excretory processes; gonotrophic relationships and spermatogenesis; and specific anatomical and physiological features of molting. The results of these studies provided a basis for the widely known monograph (Balashov, 1967) translated into English and published by the Entomological Society of America (Balashov, 1972a). This amazing monograph brought Balashov international recognition and became a desk book for several generations of medical entomologists worldwide. It is still an essential source for tick researchers today containing the precious results of countless studies in the laboratory and in the field. A special feature of his work is that it covered quite a large variety of argasid and ixodid species occurring in a huge area, in different climatic and biogeographical zones, the former USSR. He resumed, after about 20 years, in-depth studies on the structure of tick organs at an advanced methodological level. Together with his colleagues L. Amosova, V. Ivanov, S. Leonovich, and A. Reichel, he produced a series of publications on this

matter, including the unique *Atlas of Electron-Microscopic Anatomy of Ixodid Ticks* (Balashov, 1979), which provided insight into specific features of different organs and mechanisms of their functioning in these arthropods. In one way or another, the results of these studies were also considered in Balashov's subsequent monographs (1982; 1998; 2009) as a factual basis for his theoretical generalizations. In particular, they allowed the conclusion that "the main difference [of digestion in argasid and ixodid ticks] to that in insects is that the host blood is digested mainly intracellularly, a process progressing slowly and asynchronously in different parts of the gut" (Balashov, 1999, p. 758). [He mentioned in an earlier publication (1972a, p. 272) that intracellular blood digestion in ticks was first described by Roesler (1934)]. This is also a highly relevant aspect when looking at ticks as vectors of pathogens.

Ixodid ticks take one blood meal in each postembryonic life stage. In contrast, argasid ticks have 2-4 nymphal instars with each taking a blood meal and also the adults feed several times. After feeding ticks pass through a series of different developmental phases, molting into a new phase after every next bloodmeal, or in case of the adult female sooner or later followed by oviposits. As a result, by feeding ticks in the laboratory Balashov was not only able to follow their complete life cycles but also to investigate all the various aspects of their biology in very different physiological states, an ideal basis for his comprehensive biological approach.

Beginning in the late 1950s, Balashov's attention was consistently attracted to problems of the ecology of ticks including their mobility, periodization of life cycles, and the effect of environmental factors on their abundance. The results of his first studies on the dynamics of reserve nutrients and the physiological age of activated unfed ticks provided a stimulus for research on improving methods for physiological age determination and analyzing population age structure as a whole, which was carried out by Balashov himself and other specialists for many years. Based on the analysis of specific ecological features and genetic differences between natural populations of *Ornithodoros tartakovskyi* ticks, Balashov noted that the results "...make one refuse to acknowledge that gene flow plays a significant role in the maintenance of species unity". Taking into account the low mobility of this tick and its hosts, he concluded that "elementary populations¹ occupy a space confined to a group of host burrows and may be largely isolated from neighboring populations located only a few hundred meters away". "Various landscape-geographic barriers creating unsuitable conditions for ticks break up the species range into a number of population groups in isolation from each other" (Balashov; 1971, p. 1800). He was the first to denote the hierarchy of units in the spatial population structure of certain tick species and to indicate the real landscape features (shown in maps) allowing these units to be distinguished.

Parasite hosts as ecological niches

In this regard, it is quite logical that, from the late 1970s to the early 1980s, the need arose for Balashov to contemplate the diverse relationships between bloodsucking arthropods and their hosts. Developing Beklemishev's (1970) ideas on the evolution of parasite-host relationships and types of life schemes in bloodsucking and parasitic arthropods further, Balashov proposed his own concept of the origin and development of parasitism in different groups of arthropods, which we refer to as the evolutionary polyphyletic concept. Its essence

¹ An elementary population (or core population) is an element of the spatial structure of tick populations. This is an area with a higher number of ticks than the area that surrounds it. The population as a whole may have more than one core.

is that "... a long co-existence of arthropods and terrestrial vertebrates implies the possibility of emergence and dissolution of various forms of symbiotic relationships between them, including parasitism. The diversity of types of parasitism in insects and mites associated with its repeated and independent appearance. In particular therefore, blood sucking occurred in different families independently..." (Balashov, 2006a, p. 420; 2006b, p. 929). Based on this premise, Balashov (1982) proposed his "classification system of the types of parasitism in arthropods", which he continued to improve conceptually and terminologically over almost 40 years. In the final variant, this system included seven groups with different types of parasitism: (1) micro predators (free-living bloodsuckers), (2) nest-burrow ectoparasites with short feeding(s), (3) temporary ectoparasites with long feeding(s), (4) permanent ectoparasites, (5) intracutaneous parasites, (6) caviar parasites [egg or aviary], and (7) tissue parasites (Balashov, 2009, p. 33). He emphasized that "almost all conceivable instances of transitions from predation and schizophagy² to facultative ectoparasitism and from ectoparasitism to endoparasitism have occurred among arthropods parasitizing terrestrial vertebrates." Thus, there are no distinct boundaries between the different types of parasitism.

The term "type of parasitism" is regarded synonymous to the terms "type of life scheme" (Balashov, 1991, p. 190) and "life form" or "ecological group" (Balashov, 2006b, p. 930). At the same time, "it should be remembered that as ecological categories, these terms can combine species from phylogenetically unrelated taxa. Similar life patterns in many cases arose in the process of parallel evolution, although in some taxa comparative parasitological series may coincide with phylogenetics" (Balashov, 1991, p. 190). According to his ideas "... the concept of the type of parasitism is in no way identical to the concept of ecological niche³, but much wider" (Balashov, 2002, p. 935), since each part of the host organism can be an ecological niche, which is mastered by certain parasites (Balashov, 2005, p. 444), and "the host organism is a set of many ecological niches for different species of parasites" (Balashov, 2009, pp. 227–228).

Evolution of hematophagy

Analyzing the relationships of bloodsucking arthropods with vertebrates, Balashov arrived at the conclusion that "hematophagy has evolved independently and asynchronously in several arthropod orders, families, and even genera" (Balashov, 1999, p. 759), "...but once emerged, it has largely determined subsequent directions in the evolution of bloodsuckers and particularly their co-evolution with vertebrate hosts" (pp. 751–752). "For the occurrence of hematophagy [among arthropods], the most important representatives had morphophysiological preadaptations to blood nutrition" (p. 758). "The necessity of piercing the skin of vertebrates and sucking the blood caused the convergent development of the oral apparatus of the piercing-sucking or cutting-sucking type" (p. 753). "Hematophagy in ixodid ticks could have arisen as early as 150–200 million years ago during the Triassic; in some groups of insects (lice, biting midges, fleas), during the Jurassic (145–200 million years ago); and in mosquitoes and flies (horseflies in particular), only during the Paleogene" (23–66 million

² Schizophagy: the ability to eat decaying animal or vegetable residues or suck out the contents of recently died arthropods, etc.

³ In ecology, the concept of "ecological niche" is a set of all environmental factors that determine the possibility of the existence of a given species in nature. According to Balashov (2009, p. 351), "ecological niche determines the place and role of a parasite in the community. It includes parameters of the parasite's habitats, its interactions with the host organisms, and the external environment".

years ago (p. 751). According to Balashov (2009, p. 347) the concept of parasitism means “permanent or temporary cohabitation of different species, in which one of them uses another species (host) as a source of food or habitat”. Moreover, “the categories of parasitism and hematophagy applied to Insecta and Acarina do not always coincide” (Balashov, 2009, p. 210), because “hematophagy is not necessarily associated with parasitism. Among Diptera it [hematophagy] is peculiar to many groups actively attacking vertebrates but not living on their body. In turn, not all parasitic arthropods are hematophagous and many feed on wool, feathers, skin particles, secretions of skin glands and other parts of the host organism” (Balashov, 1999, p. 761). “Parasitism apparently evolved repeatedly and independently in different groups of the Acarina, the initial stages of transition to parasitism progressing in the dwellings of prospective hosts” (Balashov, 2000, p. 937). In Balashov’s opinion, free-living bloodsuckers are not “fully functional components of parasite communities”⁴ (Balashov, 2002, p. 936). He particularized the vague notion of “parasite specificity” and, in addition to conventional host specificity, introduced new concepts of phylogenetic and ecological specificity, substantiating them as follows: “The specificity of parasites in the choice of hosts may be conditioned both by affiliation of the latter with certain taxonomic groups (phylogenetic specificity) and by ecological factors, in cases where a parasite can live on unrelated host species inhabiting the same biotopes or occupying similar ecological niches⁵ (ecological specificity)” (Balashov, 2001, p. 475). These considerations led Balashov to analyze the origins of parasitic and bloodsucking arthropods and their coevolution with host species, which explained almost any of their morphological and biological features as well as the underlying speciation processes. This problem was analyzed in most detail for the group of ixodid ticks. In Balashov’s opinion, “proixodids might have initially fed on various arthropods or their dead bodies and then shifted to hematophagy on vertebrates” (Balashov, 2006a, p. 416). “Paleontological and zoogeographic data provide evidence for the Mesozoic origin of ixodid ticks” (Balashov, 1989, p. 457). “The common ancestral group of the Argasidae and the Ixodidae must have existed long before the Cretaceous”, in the Early Mesozoic, and “...became segregated into an individual evolutionary branch in the Triassic” and “...transition to parasitism in the common ancestors of the recent Ixodidae and Argasidae could have occurred during the Late Paleozoic or Early Mesozoic (about 200–250 million years ago), under tropical climate conditions” (Balashov, 2004, pp. 913, 915, 919). “The parasitic relationships of the ancestors of the Ixodidae with mammals formed by the Middle Mesozoic or even earlier” (Balashov, 1989, p. 457). “At an early stage of its evolutionary development, after transition to hematophagy, the proixodoid lineage divided into two main branches: the ancestors of the Argasidae and the Ixodidae” (Balashov, 1999, p. 750). “Two recent genera, *Carios* and *Aponomma*⁶, already existed as early as in the Cretaceous (65–100 million years ago), and species of the genera *Amblyomma*, *Ixodes*, *Hyalomma*, and *Ornithodoros* appeared during the Eocene (30–40 million years ago)” (Balashov, 2004, p. 913).

Thus, Balashov considered that the group of ixodid ticks had formed prior to the breakup of Pangaea into Gondwana and Laurasia. Judging from specimens found in Paleogene ambers, the formation of the genera *Amblyomma* and *Ixodes* also occurred before this

⁴ Balashov (2009, p. 347) called the term “community of parasites” (parasitocenosis) as a set of parasitic individuals of various species living on one host individual.

⁵ See note 3.

⁶ *Carios* is an argasid genus or subgenus (depending on the taxonomic concept). Some species of the former ixodid genus *Aponomma* have been placed into the genus *Amblyomma*, and the remaining Australian *Aponomma* species, into the genus *Bothriocroton* (Klompen et al., 2002).

breakup, no less than 180–190 million years ago. “The genera *Haemaphysalis* and *Derma-centor* apparently evolved after the breakup of the single landmass into the northern and southern halves, with the former genus being formed under conditions of moist subtropical climate and forests of Southeastern Asia, and the latter in a temperate climate of steppe or mountain landscapes. The genera *Rhipicephalus* and *Hyalomma* appear to be younger, with the former having evolved in Africa during the period of its isolation in the Paleogene and the latter in the deserts of Western Asia prior to the formation of its land connections with Africa and the Arabian Peninsula” (Balashov, 1993, p. 935). Polyphagy⁷ and oligophagy of ixodids have caused limited or no phylogenetic parallelism with hosts in their evolution. “Restrictions in the distribution of some species are usually explained by the direct effect of unfavorable environmental factors on the non-parasitic phases rather than by the absence of suitable hosts” (Balashov, 1989, p. 457). The analysis of parasite-host relations in other arthropod groups eventually led Balashov to an extremely important conclusion, which is formulated as follows: “Coevolution in its pure form is peculiar only in a few taxa of parasitic arthropods” and, therefore, “... it has been an important, but not the only way of their speciation” (Balashov, 2009, p. 230).

Reproductive isolation of ticks

A few of Balashov’s publications are devoted to the problem of interspecific hybridization and reproductive isolation in some ixodid tick species (Balashov et al., 1998), still a very relevant topic. It has been established experimentally that hybridization can happen between closely related species of ticks. In particular, hybrid female ticks of the ricinus/persulcatus group of the first generation (F1) oviposited after engorgement, but the next generation (F2) did not produce fertile offspring. According to Balashov (1998), there is reproductive isolation, which is due to the genetic incompatibility of ticks of different species.

Natural focality of diseases

The implications drawn from all the above accounted for Balashov’s broad general parasitological and biocenological approach to the problem of the natural focality of diseases, which always remained in the focus of his attention. Balashov’s particular contribution to the study of the epizootiology of various arthropod-borne pathogens and their invasions is described in his last monograph (Balashov, 2009). Here we limit ourselves to considering only some of his general conclusions, definitions, and concepts that we regard as fundamentally important. Unfortunately, they are often disregarded in papers today. Balashov’s initial premise, formulated more than 45 years ago, was that “a focus of infection is a fine self-regulating system whose individual components are connected by feedback loops” (Balashov, 1972b, p. 175). Having analyzed feedback connections in an ixodid tick-vertebrate parasitic system, he arrived at the conclusion that “the high stability of such systems is attributable to moderate intensity of immune reactions in the hosts and relatively low numbers of ticks feeding on them” (Balashov, 1992, p. 185). He further explains that this stability “is provided by complex parasite–host interactions at the stage of feeding. As a result of such interactions, the vertebrate host is sensitized to antigens of vector saliva and develops anti-tick resistance. In nature, however, the main hosts do not have absolute resistance, despite regular contact with ticks” (p. 194). Such balanced relationships also prevail between ixodid ticks and

⁷ In this context, polyphagy means that there are many different hosts, which is characteristic of at least some parasitic stages in the life cycle of all members of given genus or a particular species.

agents of transmissible infections, so that “pathogens cause minimum harm to tick vectors and can persist in their bodies almost lifelong, retaining the ability to be transmitted both to vertebrate hosts and within the tick population” (Balashov, 1995, p. 337). Furthermore, “the eventual location of microorganisms in certain organs or cells of the vector depends on the possibility for them to penetrate the system of organ envelopes and membranes as well as on the suitability of certain cells for the existence of those pathogens” (Balashov, 1984b, p. 30). “Actually, ixodid ticks can be part of several different natural foci within one ecosystem” (Balashov, 1972a, p. 338), but the circle of tick hosts is wider than the circle of animals that are susceptible⁸ [without the influence of any other factors] to a particular pathogen (Balashov, 1972b). Vectors of infection as well as reservoir hosts of pathogens may be of different levels: principal (main), accessory (secondary), or incidental. It was very timely that Balashov (2009) once again made a point of these elementary notions of epizootiology, which had almost fallen into oblivion.

“Several conditions must be met to join a new parasitic community: First, the establishment of contact with a host; second, morphophysiological suitability of the host for the parasite; and third, the ability of the parasite to occupy its ecological niche and coexist with other arthropod species living on the same host. The results of these interactions determine the specific occurrence in nature of certain parasite species. Violation of one of these conditions prevents the colonization of a new host” (Balashov, 2002, p. 938). Therefore, “even in cases of frequent transcontinental transfer of ticks by birds migrating between Europe, Africa, and Asia, migrants are usually incapable of establishing themselves in new regions” (Balashov, 2004, p. 917). Here, these words concern arthropod vectors, but they are equally applicable to agents of infections and invasions with natural focality.

Today, despite the distinct progress in our knowledge of ticks and tick-borne pathogens we still cannot but agree with Balashov’s statement made more than 35 years ago: “Unfortunately, we are still very far from understanding the holistic picture of the complex interactions of pathogens of vector-borne infections with the arthropod vectors, which ultimately determine the possibility of further circulation of the pathogenic agent in nature or its death in the deadlock of infection” (Balashov, 1984a, p. 334).

Obviously, Balashov’s scientific legacy includes ideas that can serve as starting points for further research on the problems of medical entomology and therefore deserve in-depth and comprehensive ongoing analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their deep gratitude to Professor Pat Nuttall (Department of Zoology, University of Oxford, UK) for constructive advice on the structure of the article.

REFERENCES

- Balashov Yu.S. 1967. Bloodsucking Ticks (Ixodoidea) – Vectors of Diseases of Man and Animals. Leningrad, Nauka, 319 p. [in Russian]
- Balashov Yu.S. 1971. Genotypic differences between natural populations of *Ornithodoros tartakovskyi* ticks (Ixodoidea, Argasidae). Zoologichesky Zhurnal 50 (12): 1795–1802. [in Russian].
- Balashov Yu.S. 1972a. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – vectors of diseases of man and animals. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America 8 (5): 159–376.

⁸ The term “susceptibility” in the biological and medical literature means the ability of a given host species to respond to the introduction of a pathogen by the development of an infectious process, regardless of its outcome (Kucheruk, Rosický, 1983).

- Balashov Yu.S. 1972b. Pathogenicity of transmissible disease agents for arthropod vectors. In: Petrishchev PA (ed.) Achievements and Prospects for Future Development of the Theory of Natural Focality of Human Diseases. Moscow, Meditsina, 162–179 pp. [in Russian].
- Balashov Yu.S. (ed.) 1979. Atlas of Electron-Microscopic Anatomy of Ixodid Ticks. Leningrad, Nauka, 256 p. [in Russian].
- Balashov Yu.S. 1982. Parasite-Host Relationships of Arthropods with Terrestrial Vertebrates. Leningrad, Nauka, 316 p. [in Russian].
- Balashov Yu.S. (ed.) 1983. An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure. Translation Special Publication of the Entomological Society of America, Maryland, 289 p.
- Balashov Yu.S. 1984a. Yevgeny N. Pavlovsky's ideas of modern parasitology. *Zoologicheskyy Zhurnal* 63 (3): 325–337 [in Russian].
- Balashov Yu.S. 1984b. Role of specific morphological features of bloodsucking arthropods in transmission of infectious agents. *Parazitologicheskii Sbornik (Collected Papers in Parasitology)*. Leningrad, Nauka 32: 22–42 [in Russian].
- Balashov Yu.S. 1989. Coevolution of ixodid ticks and terrestrial vertebrates. *Parazitologiya* 23 (6): 457–468 [in Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/1989/prz_1989_6_1_Balashov.pdf
- Balashov Yu.S. 1991. The significance of V.N. Beklemishev's concepts of parasitic systems and ecological groups of species for the development of parasitology. *Parazitologiya* 25 (3): 185–195 [in Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/1991/prz_1991_3_1_%D0%92alash%D0%BEv.pdf
- Balashov Yu.S. 1992. Peculiarities of the parasitic system ixodid tick–vertebrate animal. *Parazitologiya* 26 (3): 185–197 [in Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/1992/prz_1992_3_1_%D0%92alash%D0%BEv.pdf
- Balashov Yu.S. 1993. Importance of continental drift in the distribution and evolution of ixodid ticks. *Entomologicheskoe Obozrenie* 72 (4): 929–936 [in Russian]. [Balashov Yu.S., 1994. Importance of continental drift in the distribution and evolution of ixodid ticks. *Entomological Review* 73: 42–50.]
- Balashov Yu.S. 1995. Relationships of ixodid ticks (Ixodoidea) with agents of transmissible diseases of vertebrates. *Parazitologiya* 29 (5): 337–352 [in Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/1995/prz_1995_5_1_Balashov.pdf
- Balashov Yu.S. 1998. Ixodid Ticks: Parasites and Vectors of Infections. St. Petersburg, Nauka, 287 p. [in Russian].
- Balashov Yu.S. 1999. Evolution of haematophagy in insects and ticks. *Entomologicheskoe Obozrenie* 78 (3): 749–763 [in Russian]. [Balashov Yu.S.: 1999. Evolution of Haematophagy in Insects and Ticks. *Entomological review* 79 (8): 943–954.]
- Balashov Yu.S. 2000. Evolution of nidicolous parasitism in insects and acarines. *Entomologicheskoe Obozrenie* 79 (4): 925–940 [in Russian]. [Balashov Yu.S. 2000. Evolution of nidicolous parasitism in insects and acarines. *Entomological review* 80 (9): 1103–1114.]
- Balashov Yu.S. 2001. Specificity of host–parasite relations between arthropods and terrestrial vertebrates. *Parazitologiya* 35 (6): 473–489 [in Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/2001/prz_2001_6_1_Balashov.pdf
- Balashov Yu.S. 2002. Species diversity of insect and acarine parasite communities on mammalian hosts. *Entomologicheskoe Obozrenie* 81 (4): 930–943 [in Russian]. [Balashov Yu.S. 2002. Species diversity of insect and acarine parasite communities on mammalian hosts. *Entomological review* 82 (8): 1035–1046.]
- Balashov Yu.S. 2003. Academician E.N. Pavlovsky's school of thought in parasitology in the Zoological Institute RAS. *Parazitologiya* 37 (4): 249–258 [in Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/2003/prz_2003_4_1_Balashov.pdf
- Balashov Yu.S. 2004. The main trends in the evolution of ticks (Ixodida). *Entomologicheskoe Obozrenie* 83 (4): 909–923 [in Russian]. [Balashov Yu.S. 2004. The main trends in the evolution of ticks (Ixodida). *Entomological review* 84 (7): 814–824.]
- Balashov Yu.S. 2005. Ecological niches of ectoparasites. *Parazitologiya* 39 (6): 441–456 [in Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/2005/prz_2005_6_1_Balashov.pdf
- Balashov Yu.S. 2006a. The origin and evolution of parasitism on terrestrial vertebrates in insects, mites, and ticks. *Parazitologiya* 40 (5): 409–424 [in Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/2006/prz_2006_5_1_Balashov.pdf
- Balashov Yu.S. 2006b. Types of parasitism of acarines and insects on terrestrial vertebrates. *Entomologicheskoe Obozrenie* 85 (4): 918–936 [in Russian]. [Balashov Yu.S. 2006b. Types of parasitism of acarines and insects on terrestrial vertebrates. *Entomological review* 86 (8): 957–972. <https://doi.org/10.1134/S0013873806080112>]
- Balashov Yu.S. 2009. Parasitism of Ticks and Insects on Terrestrial Vertebrates. St. Petersburg, Nauka, 358 p. [in Russian].

- Balashov Yu.S., Grigorieva L.A., Oliver J. 1998. Reproductive isolation and interspecific hybridization of ixodid ticks of the *I. ricinus* – *I. persulcatus* group (Acarina, Ixodidae). Entomologicheskoe Obozrenie 77 (3): 713–722 [in Russian].
- [Balashov Yu.S., Grigorieva L.A., Oliver J. 1998. Reproductive isolation and interspecific hybridization of ixodid ticks of the *I. ricinus* – *I. persulcatus* group (Acarina, Ixodidae). Entomological review 78 (4): 500–508.]
- Balashov Yu.S., Gutsevich A.V., Derbeneva-Ukhova V.P., Shipitsyna N.K. 1968. Medical and veterinary entomology in the USSR. Entomologicheskoe Obozrenie 47 (2): 298–316 [in Russian].
- Beklemishev V.N. 1970. Biocenological Foundations of Comparative Parasitology. Moscow, Nauka, 502 p. [in Russian].
- Filippova N.A. 2013. Yuri Sergeevich Balashov, 25 December 1931–28 September 2012. Journal of Parasitology 99 (5): 927–929. <https://www.jstor.org/stable/41982118>
- Klompen H., Dobson S.J., Barker S.C. 2002. A new subfamily, Bothriocrotoninae n. subfam., for the genus *Bothriocroton* Keirans, King & Sharrad, 1994 status amend (Ixodida: Ixodidae), and the synonymy of *Aponomma* Neumann, 1899 with *Amblyomma* Koch, 1844. Systematic Parasitology 53: 101–107. <https://doi.org/10.1023/A:1020466007722>
- Korenberg E.I. 1999. Book review: Yu.S. Balashov, Ixodid Ticks: Parasites and Vectors of Infections, Nauka, 1998. Zoologicheskyy Zhurnal 78 (11): 1257–1259 [in Russian].
- Korenberg E.I. 2010. Book review: Yu.S. Balashov, Parasitism of Ticks and Insects on Terrestrial Vertebrates, Nauka, 2009. Zoologicheskyy Zhurnal 89 (1): 121–125 [In Russian].
- Kucheruk V.V., Rosický B. 1983. Diseases with natural foci: basic terms and concepts. Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology 27 (4)s: 353–364.
- Medvedev S.G. 2012. In memoriam of Yuri Sergeevich Balashov, 1931–2012. Acarina 20 (2): 199–200. https://elib.utmn.ru/jspui/bitstream/ru-tsu/12774/1/Medvedev2012_Balashov_orbituary.pdf
- Medvedev S.G., Filippova N.A., Leonovich S.A. 2013. In memory of Yuri Sergeevich Balashov (25. XII. 1931–28. IX. 2012). Parazitologiya 47 (3): 185–196 [in Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/2013/prz_2013_3_1_Medvedev.pdf
- Pavlovsky E.N. 1939. On the natural foci of infectious and parasitic diseases. Bulletin of the USSR Academy of Sciences 10: 98–108 [in Russian].
- Pavlovsky E.N. 1966. Natural Nidality of Transmissible Diseases. Urbana, Illinois, University of Illinois Press, 261 p.
- Roesler R. 1934. Histologische, physiologische und serologische. Untersuchungen über die Verdauung bei der Zeckengattung *Ixodes* Latr. Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere 28 (3): 297–317. <https://www.jstor.org/stable/43261463>

ПРОФЕССОР ЮРИЙ СЕРГЕЕВИЧ БАЛАШОВ: НАСЛЕДИЕ ВЫДАЮЩЕГОСЯ ПАРАЗИТОЛОГА

Э. И. Коренберг, О. Кал

Ключевые слова: паразитология, медицинская энтомология, экология, Argasidae, Ixodidae, клещи, природный очаг инфекции

РЕЗЮМЕ

Статья посвящена научным достижениям выдающегося паразитолога Ю.С. Балашова. Это не биография. Цель данной статьи – осветить некоторые аспекты научного наследия Ю.С. Балашова, особенно те, которые, по мнению авторов, наиболее важны для интернационального читателя. Это должно привлечь внимание исследователей разных стран к различным научным трудам и концепциям, часть которых была опубликована только на русском языке, и способствовать их более широкому обсуждению. Масштаб научных интересов Балашова был поразителен, хотя основное внимание он уделял исследованию аргасовых и иксодовых клещей (Argasidae и Ixodidae). Главные результаты и заключения его обширных работ описаны в основном с использованием его собственных слов и выражений. Авторам принадлежат только некоторые объяснения, предназначенные для лучшего понимания читателем концепций, терминов и мыслей Ю.С. Балашова.

УДК 571.27: 595.143

РОЛЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ИММУНИТЕТЕ ПАЗАРИТИЧЕСКИХ ПИЯВОК (ANNELIDA, HIRUDINEA)

© 2021 г. И. А. Кайгородова*

Лимнологический институт СО РАН,
ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033 Россия
* e-mail: irina@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 20.08.2020 г.

После доработки 21.10.2020 г.

Принята к печати 25.10.2020 г.

В обзоре кратко изложено современное состояние знаний об иммунитете пиявок с особым акцентом на роль антимикробных пептидов (АМП), подчеркивается широкое разнообразие первичных структур АМП, которые, по-видимому, коррелируют с разнообразием жизненных стратегий и экологией эктопаразитов. Антимикробные белки и пептиды представляют собой разнообразный класс природных молекул, которые вырабатываются всеми живыми организмами в ответ на атаку патогена и которые являются важнейшим компонентом иммунной системы. АМП могут обладать широким спектром антибиотической активности против чужеродных и потенциально патогенных бактерий, грибов и вирусов. Не последнюю роль АМП играют при отборе колонизирующих бактериальных симбионтов, что помогает многоклеточным организмам справляться с определенными экологическими проблемами. Особенно важны АМП для беспозвоночных ввиду отсутствия у них системы адаптивного иммунитета. Хотя многие АМП обладают сходными физико-химическими свойствами (общий размер от 10 до 100 аминокислот, суммарный положительный заряд или высокое содержание цистеинов), их иммуномодулирующая активность специфична для каждого такого пептида.

Ключевые слова: паразитирующие пиявки, иммунитет, антимикробные пептиды

DOI: 10.31857/S0031184721010026

Пиявки (Hirudinea) относятся к классу кольчатых червей (Clitellata, Annelida), для половозрелых особей которых характерен поясok, особый орган, вырабатывающий репродуктивный кокон. В настоящее время известно более 720 видов пиявок, которые распространены в пресных, морских и наземных экосистемах по всему миру, и более двух третей этого биоразнообразия составляют паразитические виды (Sket, Trontelj, 2008; Kaygorodova et al., 2020). Пиявки возникли порядка 540 млн лет назад во время кембрийского взрыва, в период бурного биологического развития (Pfeiffer et al., 2005; Kaygorodova, Sherbakov, 2006; McDougall et al., 2008). Считается, что ближайшим предком паразитических пиявок являются олигохеты. Первые пиявкоподобные черви (Acanthobdellida) мозаично сочетают в своем строении примитивные признаки олигохет

семейства Lumbriculidae с признаками, присущими современным пиявкам (Ливанов, 1905; Kaygorodova, 2012; Kaygorodova et al., 2012). Филогенетические исследования показывают, что общим предком истинных пиявок (Euhirudinea), вероятно, была кровососущая пиявка с хоботком (Arhynchobdellida), а не специфический эктокомменсал, как предполагали ранее (Trontelj et al., 1999). В ходе эволюции у хищных аринхобделлидных предков пиявок могла произойти редукция хоботка, что позволило им проглатывать более крупную добычу. Вторичная приспособленность к кровососанию у бесхоботных пиявок отряда Hirudiniformes могла возникнуть благодаря преадаптации к эктопаразитарному питанию кровью. Кроме того, транскриптомный анализ выявил высокую гомологию генетических последовательностей челюстной (бесхоботной) пиявки *Hirudo medicinalis* и млекопитающих (Macagno et al., 2010), что может свидетельствовать о коэволюции в системе «хозяин–паразит» посредством молекулярной мимикрии паразита (Salzet et al., 2000).

В ходе эволюции пиявки выработали разные стратегии иммунной защиты, однако, как и другие беспозвоночные, они не обладают системой приобретенного иммунитета с системой диверсификации антител. Защищаясь от микробов, живущих в воде или почве и попадающих в организм с пищей или при травме, пиявки используют систему врожденного иммунитета в качестве основной защиты от потенциальных патогенов (Dhainaut, Scaps, 2001). Особая роль в их иммунном ответе принадлежит антимикробным пептидам (АМП), эволюционно консервативной группе защитных полипептидов (Ageitos et al., 2017).

Первым зарегистрированным АМП был лизоцим, открытый Александром Флемингом в 1922 г. Интерес к лизоциму угас после открытия пенициллина и начала «золотого века антибиотиков». Однако уже в 1960-х появление и рост микробных патогенов, устойчивых к антибиотикам, пробудил новую волну интереса к АМП. С тех пор АМП были выявлены практически во всех живых организмах, от архей до млекопитающих. В настоящее время в базе данных по антимикробным пептидам хранится более 3000 АМП (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), и этот список далеко неполный.

Благодаря древнему происхождению и широкому распространению в природе, АМП остаются ключевым компонентом иммунной системы. Известно, что АМП обладают широким спектром действия против патогенных бактерий, грибов и вирусов, обладающих оболочкой, а также губительны для паразитов и раковых клеток (de Eguileor et al., 2003). Кроме того, АМП принимают участие в регуляции качества и количества мутуалистических и комменсальных симбионтов, тем самым способствуя симбиостазу путем контроля, формирования состава и при необходимости ограничения активности симбиотической микрофлоры в определенных анатомических компартментах (кишечник, бактериомы, кожа) (Tasiemski et al., 2015). Как известно, симбионты представляют собой быстрый источник инноваций, что позволяет животным приспосабливаться к изменяющейся среде обитания (Maske et al., 2017), следовательно, АМП могут косвенно участвовать в способности пиявок справляться с изменениями окружающей среды.

Использование пиявки в качестве модельного организма в иммунологических исследованиях имеет свои преимущества. Являясь водным эктопаразитом, пиявка своим покровным эпителием вынужденно контактирует не только с множеством микроорганизмов окружающей ее среды, но и с внешними покровами хозяина, имеющими свой состав эктосимбионтов и защитных молекул. В период питания, что случается редко, пиявки максимально используют предоставленную возможность, потребляя вдвое больше собственного веса (Sawyer, 1986). При этом пища переваривается чрезвычай-

но медленно, и кровь хозяина сохраняется в кишечнике паразита длительное время (до нескольких месяцев у медицинских пиявок). Должно быть, в пищеварительной системе пиявок имеется защитный механизм, адаптированный к патогенам хозяина и предотвращающий гнилостные процессы. Не менее важным свойством пиявок является их способность к регенерации центральной нервной системы и восстановлению ее функций после травмы (Burrell et al., 2003). Анатомические особенности пиявки облегчают использование нервного тяжа пиявки *in vitro*. Нервный тяж довольно легко поддерживать в культуре в течение нескольких недель в отсутствие компонентов периферической иммунной системы и клеток крови, что позволяет сфокусировать исследования на собственном иммунном ответе, развиваемом нервной системой пиявки (Schikorski et al., 2008). Более того, как показали клинические исследования, использование пиявок в лечебных целях не вызывает иммунных реакций со стороны пациента (Singh, 2010).

В обзоре рассматриваются особенности иммунной системы пиявок с акцентом на роль в ней антимикробных пептидов (АМП), подчеркивается разнообразие первичных структур АМП, фокусируется внимание на их функциональных особенностях и механизмах действия, а также на перспективах практического применения АМП не только в медицине, но и в других отраслях человеческой деятельности.

Иммунная система пиявок

Пиявки, как и другие беспозвоночные животные, обладают системой врожденного иммунитета, в их иммунном ответе отсутствует адаптивный (приобретенный) компонент, появившийся на более поздних этапах эволюции у позвоночных (Hoffmann et al., 1999). Врожденный иммунитет играет важную роль в качестве первого барьера от микробов. Эффекторы врожденного ответа включают рецепторы распознавания образов, фагоцитарные клетки, протеолитические каскады и полипептиды с антимикробными свойствами. Несмотря на общность врожденной защиты, исследования генома показали, что даже представители одного и того же отряда беспозвоночных используют разные подходы к внутренней защите (Loker et al., 2004). Особенность пиявок состоит в том, что они имеют тесные ассоциации как с симбионтами, которые могут играть важную роль во внутренней защите, так и вынужденные контакты с хозяевами, на которых они паразитируют. Примером может служить медицинская пиявка *Hirudo verbana*, пищеварительный тракт которой необычен в двух аспектах: содержит простое микробное сообщество и хранит большое количество крови позвоночных в течение нескольких месяцев (Silver, Graf, 2011).

В ходе длительной эволюции пиявки выработали несколько стратегий иммунной защиты от микробов, с которыми они контактируют в воде или почве, а также защитные механизмы от патогенов, что попадают в организм с пищей или после травмы (Salzet et al., 2006). При этом пиявки относятся к группе примитивных вторичнополостных или целомических животных и анатомически характеризуются наличием двух компартов, содержащих свободные клетки. Во-первых, это система крови с гемоцитами: этот компармент, по-видимому, активно не связан с иммунитетом; и, во-вторых, целом, в котором содержится несколько популяций целомоцитов, играющих определенную роль в иммунной защите. Пиявки обладают специально развитым клеточным иммунитетом, направленным против патогенных микроорганизмов, включая фагоцитоз, инкапсуляцию и спонтанную цитотоксичность целомоцитов в отношении аллогенных или ксеногенных клеток. Дополнительно они выработали важный гуморальный

иммунитет, который основан на антимикробных, гемолитических и свертывающих свойствах жидкости их организма.

Клеточный иммунный ответ

Все аннелиды, включая пиявок, имеют эффекторные клетки (целоциты), которые обладают спонтанной аллогенной и ксеногенной цитотоксичностью (Suzuki, Cooper, 1995). При контакте целоцитов с клеткой-мишенью неотвратно происходит лизис последней (Cossarizza et al., 1995) по аналогии с цитотоксической активностью естественных клеток-киллеров (ЕК) у позвоночных. Как и в системе ЕК, специфичность мишени чрезвычайно широка, поскольку ксеногенные, аллогенные и даже сингенные эритроциты погибают при соответствующих условиях. Специфичность этих цитотоксических эффекторов может быть направлена на гликопротеины клеточной поверхности на поверхности клеток-мишеней, поскольку несколько определенных моно- и дисахаридов могут блокировать уничтожение. При совместном культивировании целоцитов с ЕК-чувствительными клеточными линиями мелкие целоциты (МЦ) становятся возбужденными, распространяя многочисленные псевдоподии, которые связываются с клетками-мишенями и убивают их, тогда как крупные целоциты (КЦ) агрегируют вокруг лизированных мишеней и инкапсулируют их до образования гранулем (Quaglino et al., 1996). МЦ активны во время распознавания, быстро связываются с мишенями, а КЦ являются фагоцитирующими. Одна группа клеток МЦ производит распознавание, связывание и уничтожение, тогда как функцию очистки оставшегося мусора выполняет другая группа клеток типа КЦ. Эти результаты показывают, что фагоцитоз и цитотоксичность опосредованы двумя разными типами клеток; лейкоциты кольчатых червей полифункциональны и не являются исключительно фагоцитирующими (Cooper et al., 2001), что свидетельствует о ранней дивергенции фагоцитоза и лизиса.

При исследовании миграционного поведения клеток, участвующих в воспалительных реакциях, у пиявок *Glossiphonia complanata* выявлено два разных типа клеток: ЕК-подобные клетки и клетки CD8⁺ (de Eguileor et al., 2000). Как и у других кольчатых червей, лейкоциты пиявки фагоцитируют и инкапсулируют инородный материал избирательно в зависимости от размера (de Eguileor et al., 2003). Инкапсуляция становится визуально заметна, когда паразит полностью покрыт и изолирован толстой меланотической капсулой. При травмировании пиявок в ране наблюдается массовая пролиферация лимфоцитоподобных клеток, происходящих из одного кластера (лейкопоз), как и у позвоночных животных.

Гуморальный иммунный ответ

Защитные механизмы беспозвоночных, помимо клеточного иммунитета, состоят из лизиса и агглютинации, усиленных воздействием компонентов из целомической жидкости, таких как антигенсвязывающий белок, цитокины и антимикробные вещества (Prochazkova et al., 2020). В конце XX в. было экспериментально доказано наличие комплементоподобной активности у аннелид (Cooper et al., 1995), а вскоре был выделен и **целомный цитолитический фактор** (ЦЦФ), который имеет функциональную аналогию с фактором некроза опухоли (ФНО) позвоночных (Beschlin et al., 1999). В отличие от ФНО, цитолитическая активность ЦЦФ опосредуется лизисом и не связана с протеолизом.

Помимо ЦЦФ, в целоме кольчатых червей присутствуют **порообразующие белки**, такие как эзенипор, лизенин и фетидин. Эти молекулы связываются и нарушают

липидный бислой только в тех случаях, когда присутствуют сфинголипиды (Milochau et al., 1997). Посредством канального комплекса компоненты иммунной системы аннелид разрушают чужеродные компоненты. Кроме того, перфорин-подобные белки (Kauschke et al., 1997) создают дыры в мембранах клеток-мишеней, способствуя проникновению литических молекул, таких как лизенины, лизины, фетидины и гемолизины.

Цитокины представляют собой небольшие молекулы белка (5–20 кДа), которые играют решающую роль в борьбе с инфекциями и другими иммунными реакциями (Dinarello, 2000), участвуя в аутокринной, паракринной и эндокринной передаче сигналов в качестве иммуномодулирующих агентов.

Что касается **митогенных факторов**, в целомической жидкости аннелид был идентифицирован компонент с массой 60 кДа, обладающий митогенной активностью в отношении спленоцитов мыши и названный ЦМФ (целомный митогенный фактор) (Hanusova et al., 1999). В этой же работе было показано, что целомическая жидкость аннелид, обогащенная ЦМФ, проявляет фосфолипазную активность, и PLA2-подобный фермент участвует в иммунных реакциях, таких как антибактериальные механизмы.

Антигенсвязывающие белки у аннелид состоит из двух дисульфидсвязанных полипептидных цепей (31 и 33 кДа), обе участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта (Tučkova et al., 1991).

Ингибиторы протеаз. У птичьей пиявки *T. tessulatum* был найден генный тандем цистатин В (Tt-cysb) и катепсин L (Tt-catl) (Lefebvre et al., 2004). Tt-cysb принадлежит к семейству ингибиторов цистеиновой протеазы. Его последовательность демонстрирует 54 % идентичность с цистатином В человека. Tt-cysb экспрессируется только в одной популяции циркулирующих целомических клеток. Бактериальное заражение приводит к усилению транскрипта Tt-cysb исключительно в этих клетках.

Антимикробные белки. Наиболее изученным антимикробным белком у аннелид является лизоцим (Perin, Jolles, 1972). Этот фермент расщепляет связи β -1-4 между N-ацетилглюкозаминном и N-ацетилмураминовой кислотой грамположительных бактериальных клеточных стенок. Помимо лизоцимной активности, целомическая жидкость *E. fetida andrei* проявляет антибактериальную, гемолитическую и гемагглютинирующую активность. Эти действия в основном опосредованы двумя белками, называемыми фетидинами (Lassegues et al., 1997).

У пиявок обнаружена собственная лизоцимоподобная активность для дестабилазы, несколько изоформ которой составляют семейство белков, характеризующееся активностью лизоцима (Baskova et al., 2001). Кроме того, в жировых клетках пиявок был обнаружен белок, обладающий бактериостатической активностью, принадлежащий к семейству гемэритринов (Salzet et al., 2006).

Антимикробные пептиды (АМП) в отличие от белков имеют меньшую длину полипептидной цепи (менее 100 аминокислотных остатков) и единую для всех цистеин-стабилизированных АМП структурную сигнатуру в виде γ -мотива (Yeaman, Yount, 2007). Для всех АМП характерны такие физико-химические свойства, как амфипатичность и катионный характер, обеспечивающие их биологические функции, а именно: естественную антибактериальную активность, хемотаксис иммунных клеток, иммуномодуляцию, нейтрализацию эндотоксинов, участие в регенерации нервной системы (Salzet et al., 2006). АМП пиявок были выделены из четырех гематофаговых видов: трех медицинских пиявок *Hirudo medicinalis*, *H. verbena* и *H. nipponica*, питающихся кровью преимущественно теплокровных животных, и пиявка *Theromyzon tessulatum*, паразитирующая на водоплавающих птицах. Первым аннелидным АМП был люм-

брицин, полученный из *Lumbricus rubellus* (Cho et al., 1998). Позже сходный АМП был выявлен у пиявок (Schikorski et al., 2008). В настоящее время имеются сведения о шести АМП, обнаруженных у пиявок: теромацин, теромизин, пептид В (Tasiemski et al., 2004), нейромацин, люмбрицин (Schikorski et al., 2008) и гирудомацин (Ding et al., 2019).

Роль АМП в иммунном ответе

Как было показано выше, АМП являются частью врожденного иммунного ответа и играют важную роль в первой линии защиты от микроорганизмов, локализуясь, в основном, в эпителиальных тканях внешних покровов и кишечника. Пептиды могут быть индуцибельными или конститутивными, они неспецифичны и реагируют до того, как приобретенный иммунный ответ был инициирован, они не генерируют иммунную память, они не являются каталитическими, но обеспечивают экономию клеток, будучи мелкими эффекторными молекулами (Wiesner, Vilcinskas, 2010).

В дополнение к их прямой антимикробной активности, некоторые АМП обладают различными иммуномодулирующими функциями (Afacan et al., 2012).

Вот некоторые из наиболее важных из них:

1) Хемотаксическая активность: АМП действуют прямо как хемоаттрактант, способный привлекать иммунные клетки к месту инфекции. Косвенным образом АМП индуцируют экспрессию широкого спектра хемокинов (Mookherjee, Hancock, 2007).

2) Антиэндотоксиновая активность: АМП обладают способностью подавлять выработку индуцируемых эндотоксином провоспалительных медиаторов, таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), путем блокирования или модуляции сигнальных путей толл-подобного рецептора (Bowdish, Hancock, 2005).

3) Дифференцировка иммунных клеток: АМП, по-видимому, напрямую индуцируют процессы дифференцировки и активации клеток, соединяя воедино элементы врожденного и приобретенного иммунитета (Davidson et al., 2004).

4) Заживление ран и ангиогенез: заживление ран включает повторный рост эпителиальных слоев и образование новых кровеносных сосудов (ангиогенез). АМП действуют непосредственно на эпителиальные и эндотелиальные клетки, вызывая реэпителизацию и ангиогенез. АМП также косвенно индуцируют заживление ран благодаря своим хемотаксическим эффектам (Wu et al., 2010).

Благодаря этим иммуномодулирующим и антибактериальным свойствам, АМП являются отличными кандидатами для лечения инфекций, так как они могут контролировать воспаление в месте заражения.

Разнообразие антимикробных пептидов.

Структура и свойства АМП пиявок

Открытие первых АМП в начале 1980-х годов было многообещающим для разработки новых антибиотиков (Hultmark et al., 1983) и решения проблем, связанных с множественной лекарственной устойчивостью патогенных бактерий (Afacan et al., 2012). С тех пор выяснилось, что в живой природе АМП встречаются повсеместно, от примитивных организмов до млекопитающих. Как оказалось, многие АМП филогенетически близки, что предположительно указывает на их эволюционную консервативность (Pasupuleti et al., 2012). Большинство известных АМП имеют низкую молекулярную массу (2–50 кДа). Основные характеристики АМП основаны на том, что

они представляют собой (1) молекулы суммарного положительного заряда (обычно от +2 до +9) из-за большого количества положительно заряженных аминокислот, таких как лизин и аргинин, (2) амфипатические молекулы, стабильные как в водных, так и гидрофобных растворах (Zasloff, 2002).

У АМП выявлено 4 типа вторичных структур: (1) α -спираль, (2) β -складчатый лист (3) смесь β -листов и α -спиралей и (4) линейная или случайная структура (Zhang et al., 2014). Однако большинство АМП, находясь в растворе в свободной форме не проявляют особой структуры и принимают окончательную конформацию при взаимодействии с мембраной.

АМП синтезируются в основном в поверхностных тканях, таких как эпителий кожи или кишечника, легкие или эритроциты. Эти пептиды синтезируются в 100 раз быстрее, чем иммуноглобулин, и при низких метаболических затратах, а также могут в качестве резерва накапливаться в клетках и высвобождаться, когда клетки стимулируются при контакте с патогенами (Nissen-Meyer, Nes, 1997). Таким образом, АМП являются быстрым неспецифическим способом борьбы с широким спектром микроорганизмов.

По данным международной базы антимикробных пептидов (APD) за последние 30 лет из разных источников было выделено более 3250 антимикробных пептидов (данные на 02 октября 2020 г.).

Одноклеточные производят АМП в качестве стратегии регуляции численности собственной популяции, а также для борьбы с другими микроорганизмами, конкурирующими с ними за пространство и пищевые ресурсы среды. В настоящее время известно 391 АМП, из них основную массу составляют бактериоцины (бактериальные АМП), из архей выделено 5 АМП, из протист – 8 и 20 АМП получены из грибов (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Механизм их действия разнообразен и включает порообразование, нуклеазную и пептидогликаназную активность, интерференцию с энергетическими процессами и ингибированием синтеза белка и репликации ДНК. Грамотрицательными бактериями продуцируются колицины (25–80 кДа) и микроцины (<10 кДа). К бактериоцинам, продуцируемым грамположительными бактериями, относятся линейные и глобулярные лантибиотики (<5 кДа), пептиды без лантионина (<10 кДа) и высокомолекулярные пептиды (> 30 кДа).

Растения вырабатывают небольшие богатые цистеином АМП (360 АМП по данным APD), которые выявлены во всех органах, но большее их количество накапливается в наружном слое (Nawrot et al., 2014). Большинство растительных АМП имеют молекулярную массу от 2 до 10 кДа. К ним относятся тионины, дефенсины, циклотиды, ноттиноподобные АМП, а также β -бариллины, активные только против грибов. Тионины, дефенсины и циклотиды, как было показано, обладает противоопухолевой активностью.

Животные являются наиболее важными и перспективными продуцентами АМП (2396 против 360 из растений или 358 из бактерий).

У насекомых конститутивные АМП накапливаются в клетках крови и слюнных железах, и в присутствии микробов секретируются в гемолимфу. Индуцированные АМП синтезируются после микробной инфекции (Bulet, Stöcklin, 2005). В настоящее время известно большое количество разнообразных по структуре и действию АМП, продуцируемых насекомыми (например: цекропины направлены против грамотрицательных бактерий, грибов, вирусов, а также обладают инсектицидным и противоопухолевым действием; дефенсины активны против грамположительных бактерий; дрозомидин обладает мощной противогрибковой активностью; танатин проявляет антимикробную

активность в отношении устойчивых к множеству лекарственных средств клинических изолятов *E. aerogenes* и *K. pneumoniae*; апидаецин действует против грамотрицательных бактерий; мечниковеин – против грамположительных бактерий, грибов и насекомых; инсектицидная активность выявлена у аттацина и саркотоксина) и огромное разнообразие других АМП.

У водных беспозвоночных обнаружено большое разнообразие пептидов, обладающих в основном антибактериальной и противогрибковой активностью (Ponnapra et al., 2015). Пептиды, полученные из морских организмов, способны выдерживать высокие концентрации соли, поэтому они могут иметь высокую вероятность успеха при физиологических концентрациях соли. К ним относятся АМП морских губок (дискодермины, галицилиндрамыды, теонелламыды, циклолитизиды и фориоспонгины), медуз, кораллов и других кишечнополостных (аурелины, гидрализины, стиолизины), моллюсков, включая головоногих (митилус, митилин и мицицины), ракообразных (пенаэдины, каллинектины, астацидины, тахиплезин и тахистатины), морских звезд (стронгиолоцины) и кольчатых червей (гедистин, перинерин, ареницин, мацины).

На сегодняшний день в международных базах зарегистрировано порядка 20 АМП, биохимически выделенных из 8 видов пресноводных аннелид, включая 4 пиявок. Первым аннелидным АМП был богатый пролином люмбрицин-1, выделенный из дождевого червя *Lumbricus rubellus* (Cho et al., 1998), а затем его аналог был найден у пиявок (Schikorski et al., 2008). Трехмерная структура люмбрицина представлена на рис. 1. Механизм действия люмбрицин-подобных АМП до сих пор не описаны. Их антимикробная активность относительно не велика. Это позволяет предположить, что защита от патогенов не является основной биологической функцией люмбрицина.

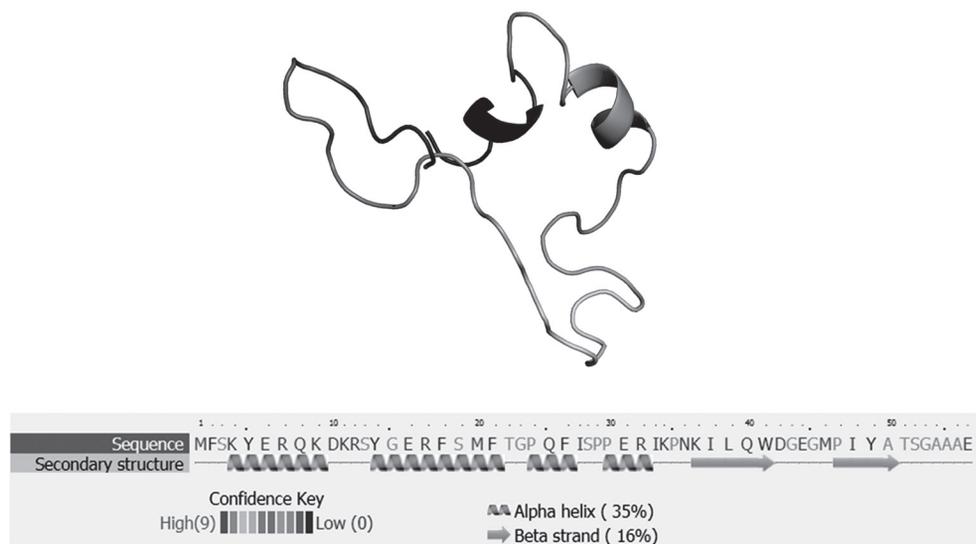


Рисунок 1. Трехмерная модель люмбрицина медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*, полученная с помощью Phyre2 (Kelley et al., 2015) на основе аминокислотной последовательности, транслированной из кДНК EU156756.

Figure 1. Three-dimensional model of lumbricin from the medicinal leech *Hirudo medicinalis* obtained with Phyre2 (Kelley et al., 2015). The reconstruction was based on the amino acid sequence translated from cDNA EU156756.

Следующим открытием были два разных пептида из птичьей пиявки *T. tessulatum*: теромизин (анионный АМП) и теромацин (катионный АМП) (Tasiemski et al., 2004).

Теромизин является линейным полипептидом, состоящим из 86 аминокислотных остатков. В третичной структуре этого пептида присутствуют три α -спирали (рис. 2). Это первый анионный антимикробный пептид, описанный у беспозвоночных. Теромизин проявляет активность, направленную против грамположительных бактерий (Tasiemski et al., 2004). Синтез полипептида наблюдается исключительно в диффузной ткани, состоящей из крупных жировых клеток, равномерно распределенных в теле пиявки и контактирующих с целомическими полостями. Уровень транскрипции теромизина у пиявки регулируется иммунным стимулом и повышается после приема пищи или бактериального заражения. Кроме того, теромизин был иммунодетектирован в целомической жидкости и кишечном эпителии (Tasiemski et al., 2004).

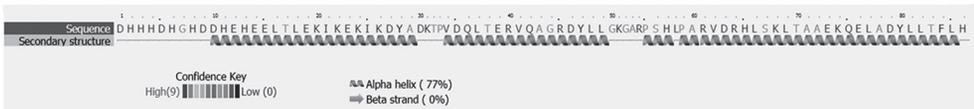
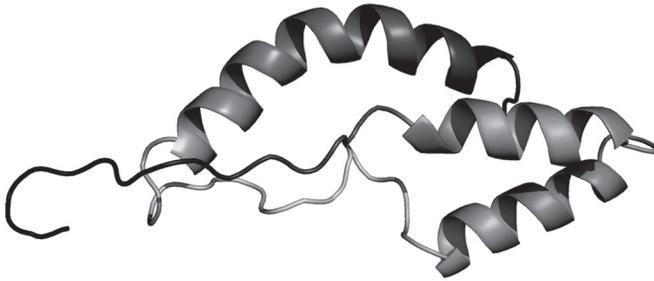


Рисунок 2. Трехмерная модель теромизина птичьей пиявки *Theromyzon tessulatum*, реконструированная с помощью Phyre2 (Kelley et al., 2015) на основе аминокислотной последовательности (MedGen UID: 265817).

Figure 2. Three-dimensional model of theromyzin from the bird leech *Theromyzon tessulatum*, reconstructed with Phyre2 (Kelley et al., 2015) basing on the amino acid sequence (MedGen UID: 265817).

Теромацин принадлежит к семейству мацинов, впервые идентифицированных у птичьих пиявок (Tasiemski et al., 2004). Мацины представляют собой семейство катионных АМП, богатых цистеином. Они имеют общий мотив CS α β , также характерный для дефенсинов беспозвоночных и токсино-подобных пептидов, найденных у скорпионов (Jung et al., 2012). Представители этого семейства пептидов были описаны у пиявок *Theromyzon tessulatum* (Tasiemski et al., 2004) и *Hirudo medicinalis* (Schikorski et al., 2008). Обе пиявки являются эктопаразитическими гематофагами позвоночных. В отличие от дефенсинов, мацины обладают нейротрофической и пролиферативной активностью в дополнение к их бактерицидному эффекту (Schikorski et al., 2008; Jung et al., 2012). АМП мацинового ряда представляют собой довольно длинные и сложные молекулы, в состав которых входят не менее 60 остатков. Третичная структура мацинов организована в узловатую складку в соответствии с расположением цистеи-

новых связей, а молекулярные поверхности пептидов разделены на два гидрофобных полушария благодаря полосообразному распределению положительных зарядов (Jung et al., 2012). Консервативными структурными особенностями пептидов маминового семейства являются дополнительная α -спираль в N-концевом положении (рис. 3 и 4) и две длинные гибкие петли (показаны в виде стрелок).



Рисунок 3. Трехмерные модели двух теромацинов, реконструированные с помощью Phyre2 (Kelley et al., 2015). *А* – теромацин птичьей пиявки *Theromyzon tessulatum* (аминокислотная последовательность AP01556). *Б* – теромацин медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* (аминокислотный транслят кДНК EU16497).

Figure 3. Three-dimensional models of two theromacins reconstructed with Phyre2 (Kelley et al., 2015). *A* – theromacin of the bird leech *Theromyzon tessulatum* (amino acid sequence AP01556). *B* – theromacin of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* (amino acid translate of cDNA EU16497).

Теромацины обеих пиявок состоят из 75 а. о. (Tasiemski et al., 2004; Schikorski et al., 2008). На рис. 3 показаны открытые циклические структуры теромацинов из птичьей и медицинской пиявок (рис. 3А и 3Б соответственно), которые имеют сходные элементы в третичных структурах, несмотря на 8%-ную разницу в аминокислотных последовательностях. В отличие от других цистеин-богатых АМП беспозвоночных,

теромацины пиявок имеют другой набор дисульфидных мостиков из-за большого количества остатков цистеина (Bulet, Stöcklin, 2005). Теромацины проявляют антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий (*B. megaterium* и *M. luteus*) (Jung et al., 2012) и низкую антибактериальную активность против грамотрицательных протеобактерий (*E. coli*) (Tasiemski et al., 2004). Их антимикробная активность снижается с увеличением концентрации солей (Jung et al., 2012), что может свидетельствовать о наличии теромацинов исключительно у пресноводных пиявок.

Нейромацин (рис. 4), выделенный из медицинской пиявки, состоит из 59 а. о. и на сегодняшний день является самым коротким АМП маминового ряда. Этот пептид имеет общую схему строения с другими АМП маминового ряда. Нейромацин вырабатывается нейронами и обладает высокой активностью в отношении грамположительных бактерий (Schikorski et al., 2008). В отличие от теромацина в первичной структуре нейромацина содержится четыре остатка гистидина, что повышает его антимикробную активность в слабощелочной среде. В дополнение к антибактериальным свойствам нейромацин действует как промотор регенеративного процесса центральной нервной системы (ЦНС) пиявки. Общеизвестно, что ЦНС кольчатых червей, включая пиявок, в отличие от ЦНС других животных, обладает способностью довольно быстро регенерировать нейриты и синаптические связи, которые после травмы восстанавливают нормальную функцию. Согласно экспериментальным данным, регенеративный процесс у медицинской пиявки усиливается бактериальной инфекцией, а индукция регенерации нормальной функции ЦНС в значительной степени зависит от одновременного нейроиммунного ответа (Schikorski et al., 2008).

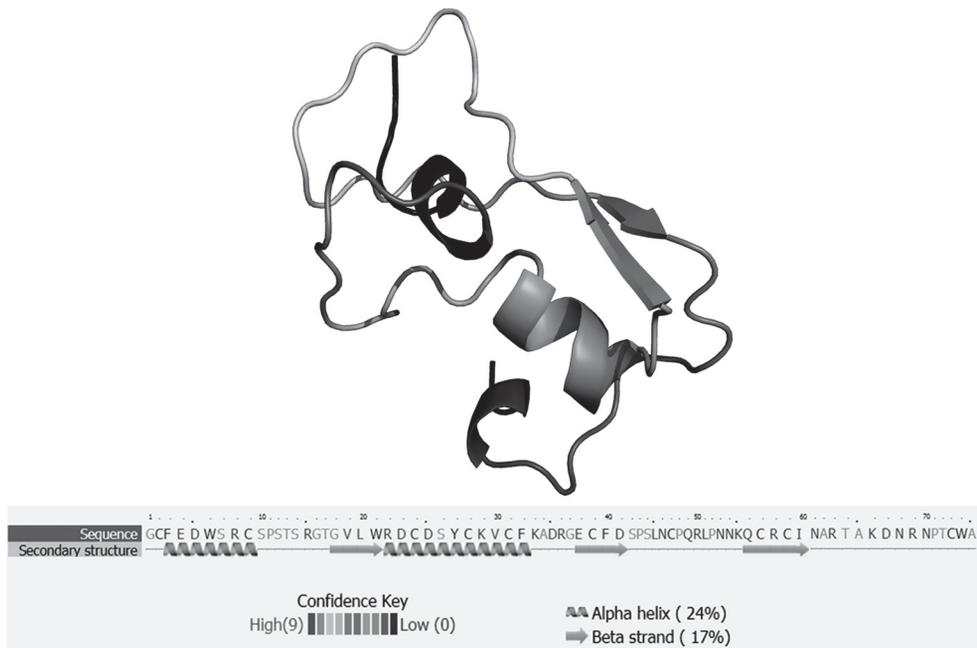


Рисунок 4. Трехмерная модель нейромацина пиявки *Hirudo medicinalis*, реконструированная с помощью Phyre2 (Kelley et al., 2015) на основе аминокислотной последовательности AP02025.

Figure 4. Three-dimensional model of neuromacin from the leech *Hirudo medicinalis* reconstructed with Phyre2 (Kelley et al., 2015) basing on the amino acid sequence AP02025.

Таким образом, теромацин из *T. tessulatum* (Tasiemski et al., 2004), нейромацин и теромацин из *H. medicinalis* (Schikorski et al., 2008) выполняют несколько функций, включая защиту от патогенов внешней среды, обеспечение кишечного симбиоза и иммунную защиту, а также участвуют в регенерации поврежденной нервной системы.

Недавно в слюнной железе азиатской гематофаговой пиявки *Hirudo nipponica* был обнаружен новый АМП гирудомацин, последовательность которого состоит из 61 аминокислотных остатков (Ding et al., 2019). Гирудомацин содержит 8 остатков цистеина, образующих 4 дисульфидных мостика, и структурно демонстрирует наибольшее сходство с членами семейства мацинов. Водородные связи стабилизируют конформацию гирудомацина с образованием вторичных структур, таких как α -спираль и β -лист (рис. 5). Зрелый полипептид проявляет антимикробное действие широкого спектра против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Синтез гирудомацина у *Hirudo nipponica* активируется на стадии питания в присутствии крови позвоночного хозяина.

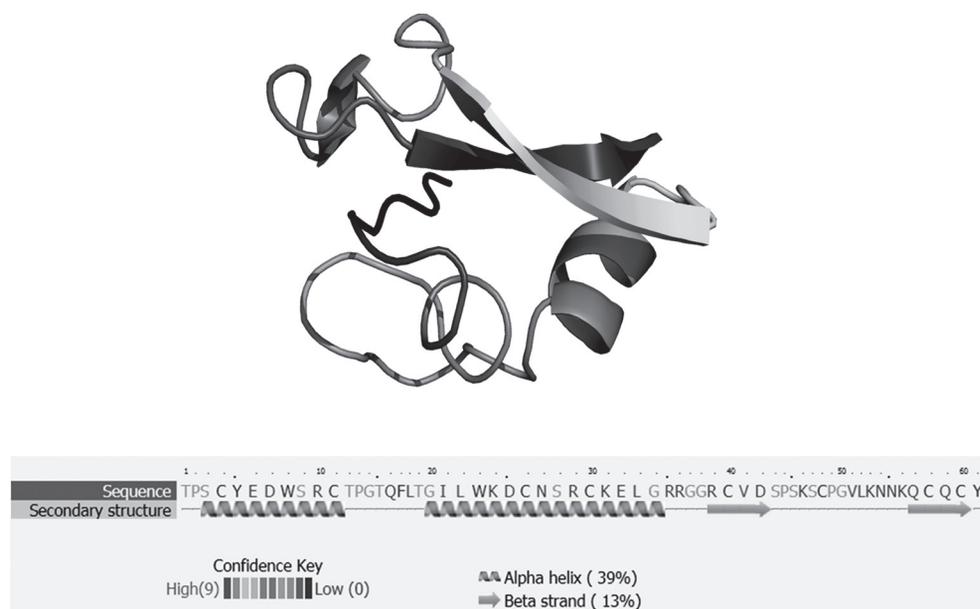


Рисунок 5. Трехмерная модель гирудомацина пиявки *Hirudo nipponica*, предсказанная с помощью Phyre2 (Kelley et al., 2015) на основе аминокислотной последовательности, транслированной из кДНК MH686152.

Figure 5. Three-dimensional model of hirudomacin from the leech *Hirudo nipponica* predicted with Phyre2 (Kelley et al., 2015) basing on the amino acid translate from cDNA MH686152.

Другим семейством АМП, богатых цистеином и обнаруженных у аннелид, является BRICHOS, первым участником которого был ареницин, выделенный из целомической жидкости морской полихеты *Arenicola marina* (Ovchinnikova et al., 2004). В настоящее время домен BRICHOS описан для предшественников таких АМП, как альвинеллацин и капителлацин (Tasiemski et al., 2014), а также никомицин (Panteleev et al., 2018). Вторичная структура большинства пептидов этого семейства характеризуется наличием β -шпильки, стабилизированной одним или двумя дисульфидными мостиками

(Tasiemski et al., 2014), однако имеются сведения о нахождении домена BRICHOS в составе предшественников α -спиральных АМП, в структуре которых отсутствуют β -шпильки (Panteleev et al., 2018).

Белки-предшественники этих АМП участвуют в основном в хемотаксисе клеток. Имеются свидетельства того, что BRICHOS участвует в сложном посттрансляционном процессинге белков и функционирует как внутримолекулярный шаперонный домен, который может связывать мотивы β -шпилек и предотвращать их самоагрегацию с образованием амилоидных фибрилл (Tasiemski et al., 2014). Присутствие домена BRICHOS может быть эволюционно обусловленной адаптацией пиявок, обеспечивающей корректное сворачивание их АМП в экстремальных условиях, например при недостатке кислорода (гипоксии) и термических нагрузках.

Механизм действия

Основные физические свойства АМП – катионный заряд и значительная доля гидрофобных остатков. Первое свойство способствует селективности отрицательно заряженных микробных цитоплазматических мембран по отношению к цвиттер-ионным мембранам многоклеточных, тогда как второе способствует взаимодействию с ацильными цепями жирных кислот (Lohner, 2001).

Многие линейные АМП не структурированы в водном растворе и требуют мембранной среды для принятия стабильной амфипатической конформации. Хотя механизм действия многих АМП включает в себя разные способы нарушения целостности бактериальной цитоплазматической мембраны, стали известны и другие антимикробные механизмы, которые нацелены на ключевые клеточные процессы, включая синтез ДНК и белка, укладку белка, ферментативную активность и синтез клеточной стенки (Brogden, 2005; Nicolas, 2009). Действительно, катионные свойства АМП способствуют взаимодействию с отрицательно заряженными фрагментами других биомолекул, таких как липиды внешней мембраны, нуклеиновые кислоты и фосфорилированные белки. У инфицированного животного может одновременно выделяться несколько изоформ или структурно сходных АМП, которые действуют с помощью разных механизмов для достижения общего синергетического эффекта (Mangoni, Shai, 2009). Кроме того, некоторые АМП могут иметь несколько вариантов действия (стратегия множественных попаданий), что повышает их эффективность и способствует уклонению от потенциальных механизмов резистентности.

Таким образом, АМП по механизму действия можно условно разделить на два класса: мембраноактивные (membrane disruptor) и внемембраноактивные (non-membrane disruptor) (Huerta-Cantillo, Navarro-García, 2016); и в том и другом случае изначальной целью является взаимодействие с плазматической мембраной посредством электростатических зарядов.

Пептиды, разрушающие мембрану, составляют подавляющее большинство, и многие из них имеют α -спиральные структуры, которые непосредственно действуют на уровне плазматической мембраны, изменяя проницаемость клеток или лизируя клетки посредством образования пор. Мембраноактивные АМП можно подразделить на две группы в зависимости от их биологической активности: (1) селективные, которые активны в отношении бактерий, но неактивны в отношении клеток животного, и (2) неселективные, которые обладают активностью в отношении обоих типов клеток.

Механизм действия α -спиральных АМП определяется следующими этапами (по: Huerta-Cantillo, Navarro-García, 2016):

1. Электростатическое связывание АМП с фосфолипидами мембраны.

АМП располагаются на мембране так, чтобы их положительно-заряженные аминокислоты спрягались с отрицательно-заряженными головками фосфолипидов. Это позволяет АМП оставаться параллельно ориентированными на мембране при низкой локальной концентрации пептида. В таком состоянии АМП остаются неактивными.

2. Когда локальная концентрация пептида увеличивается, у него возникает тенденция принимать перпендикулярную ориентацию по отношению к мембране. В таком положении пептид становится активным и внедряется в мембрану.

3. Наконец, введение пептидов изменяет проницаемость липидного бислоя, или лизис клеток происходит путем образования поры бочкообразного типа или нарушения структуры тороидальных пор.

АМП, не связанные с мембранами (внемембранные), используют разнообразные механизмы действия, среди которых: связывание с нуклеиновыми кислотами (ДНК или РНК), вмешательство в синтез нуклеиновых кислот, ингибирование синтеза белков, ингибирование ферментативной активности, ингибирование синтеза клеточной стенки, повреждение клеток в результате накопления пептидов внутри клетки, флокуляция внутриклеточных компонентов, структурные изменения в перегородках и блокирование некоторых факторов вирулентности (Brogden, 2005; Nguyen et al., 2011), что подавляет подвижность бактерии или снижает ее патогенность, тем самым позволяет контролировать заражение.

Помимо своей прямой антимикробной активности, АМП могут выполнять функцию защиты организма пиявки с помощью иммуномодулирующих механизмов (Zhang, Gallo, 2016), таких как хемотаксическая активность, привлекающая иммунные клетки; модуляция чувствительности клеток пиявки к лигандам толл-подобных рецепторов; стимуляция ангиогенеза при регенерации повреждённых тканей, ликвидации очагов воспаления, образовании рубца и других подобных процессах восстановления; модуляция экспрессии противовоспалительных цитокинов или хемокинов.

Особую роль АМП играют в качестве врожденных регуляторов в кишечнике (Muniz et al., 2012). Кишечный эпителий подвергается воздействию множества патогенов, поэтому эндогенные АМП необходимы здесь для защиты от чужеродных внедрений и инфекций. Становится все более очевидным, что АМП формируют состав комменсальной микробиоты и помогают поддерживать кишечный гомеостаз у пиявок и не только (Tasiemski et al., 2015). Экспрессия АМП строго контролируется вовлечением рецепторов распознавания образов, и их нарушение связано с аномальными реакциями организма на инфекцию и воспалительные заболевания кишечника.

Механизм действия мацинов, как и других катионных АМП, включает повышение проницаемости мембраны грамположительных бактерий, а также образование пор (Boidin-Wichlacz et al., 2012). Благодаря структурным особенностям и двойному амфипатическому действию (два гидрофобных полушария, зажатых поясом положительных зарядов), мацины способствуют агрегации бактерий, а затем проникают бактериальную мембрану. В дополнение к антибактериальной активности нейромацин и теромацин участвуют в регенерации нервных волокон (Jung et al., 2012; Schikorski et al., 2008). У медицинской пиявки *H. medicinalis* теромацин выделяется в кровь, окружающую нервную систему, а нейромацин продуцируется нервными клетками и накапливается в пораженном участке центральной нервной системы (Tasiemski, Salzet, 2010), тогда как теромацин птичьей пиявки *T. tessulatum* экспрессируется в крупных жировых клетках и сразу же высвобождается в целомическую жидкость после инфекций или повреждений центральной нервной системы (Jung et al., 2012; Tasiemski et al., 2004).

Применение АМП

Структурные и функциональные характеристики АМП, а также такие их свойства, как низкая токсичность для эукариотических клеток, широкий спектр действия против различных патогенных микроорганизмов и иммуномодулирующие эффекты делают АМП ценными терапевтическими и профилактическими агентами (Dubin et al., 2005). Несмотря на то, что остаются некоторые ограничения, контроль уровня АМП может представлять собой важную парадигму для лечения широкого спектра заболеваний человека и животных.

Косвенные функции АМП, одной из которых является их участие в формировании состава комменсальной микробиоты животных и человека, тоже интересны для практического применения в медицине. Нарушение стабильности микробиома может привести к серьезным последствиям для здоровья, включая ожирение, рецидивирующие инфекции и таким заболеваниям, как синдром воспаленного кишечника и атопический дерматит. Как оказалось, зачастую перечисленные симптомы клинически связаны с дефектными антибактериальными механизмами, в частности с дефицитом дефензинов (Zhang, Gallo, 2016). Избыточный синтез АМП, в свою очередь, может инициировать воспалительные заболевания. Такие заболевания кожи, как псориаз и розацеа сопровождаются повышенным уровнем экспрессии АМП кателицидина (Zhang, Gallo, 2016). Учитывая роль пептидов в качестве модуляторов врожденного иммунного ответа, АМП могут быть потенциально пригодны для разработки иммуномодулирующих методов лечения или для коррекции подобных нарушений.

Основной интерес, проявляемый к АМП, связан с перспективой их использования в качестве кардинально новых противоифекционных средств следующего поколения и новых методов более избирательной борьбы с патогенами, что, несомненно, важно для решения общечеловеческих проблем, связанных со снижением эффективности обычных антибиотиков из-за возросшей лекарственной устойчивости патогенных бактерий. Механизм, с помощью которого действуют эти пептиды, очень затрудняет выработку устойчивости бактерий, что открывает многообещающую перспективу применения АМП в качестве более стойких терапевтических агентов. Важным преимуществом АМП является отсутствие у микроорганизмов механизма наследственной передачи устойчивости к ним; в отличие от традиционных антибиотиков, применение АМП в лечебных целях не влияет на естественную микрофлору пациентов (Afacan et al., 2012). Еще одним плюсом АМП является их способность распознавать определенные типы плазматических мембран, и эта селективность позволяет им дифференцированно распознавать нормальные клетки, клетки незлокачественной опухоли и клетки злокачественной опухоли, потому АМП могут быть использованы в лечении онкологических заболеваний (Huerta-Cantillo, Navarro-García, 2016).

АМП соответствуют многим требованиям фармацевтической промышленности, сельского хозяйства, аквакультуры и производства продуктов питания. Некоторые АМП уже нашли свое применение. АМП бактерий (бактериоцины) используются для ингибирования важных патогенов животных, людей и растений, в том числе энтеротоксиногенной *E. coli*, резистентных стафилококков и энтерококков, *Agrobacterium* и *Brenneria* spp. (Yang et al., 2014). Например, бактериальный пептид низин широко используется в качестве безопасного пищевого консерванта, для сохранения свежести роз и лечения рыб. Дефенсины и кателицидины млекопитающих оказались активны против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и других венерических заболева-

ний (Brogden, 2005). АМП из кожи лягушки обладают спермицидной активностью и могут найти применение в качестве негормональных противозачаточных средств (Zairi et al., 2009). В растениеводстве на замену токсичных для человека и окружающей среды пестицидов приходят трансгенные растения, экспрессирующие антимикробные пептиды (Nawrot et al., 2014). Манипулирование генами, кодирующими АМП у крабов, креветок и мидий, позволяет получать пригодные для культивирования организмы, более устойчивые к болезням (Ponnappan et al., 2015). Что касается пиявок, их антикоагулирующее действие было издревле известно и до сих пор используется в гирудотерапии как в Европе, так и в Азии (Singh, 2010). В наши дни практический интерес к пиявкам возобновился. Как оказалось, в процессе кровососания пиявки-гематофаги выделяют не только гирудин, но и другие биологически активные вещества для предотвращения коагуляции и гниения (Ding et al., 2019). Пептиды пиявок имеют много важных преимуществ, наиболее специфичным из которых является способность преодолевать иммунный ответ при восстановлении нервной системы (Boidin-Wichlacz et al., 2012). К преимуществам фармацевтических разработок на основе АМП пиявок относятся биохимическая совместимость с позвоночным хозяином, нетоксичность для комменсальной микрофлоры, термостабильность, солеустойчивость и широкий спектр антимикробной активности (Bruno et al., 2019). Несмотря на разнообразие жизненных стратегий, имеющих у пиявок (паразиты/непаразиты; специалисты/генералисты; эндемики/космополиты; экстремофилы/нейтрофилы и т.д.), АМП исследованы только у ограниченного числа гематофаговых видов, паразитирующих на позвоночных. Это открывает широкую перспективу для поиска новых, возможно, уникальных АМП.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность Орели Тазиемски и Франсуа Массоллю (Институт Пастера, Франция) за инициацию и поддержание интереса к данной теме.

Работа выполнена в рамках Государственного задания 0279-2021-0011 при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-29-05097_офи м).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ливанов Н. А. 1905. *Acanthobdella peledina* Grube, 1851. Морфологическое исследование. Ученые записки Казанского университета 72 (5–8): 1–266. [Livanow N. 1905. *Acanthobdella peledina* Grube, 1851. Morphological Study. Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta 72: 1–266. (in Russian)]
- Afacan N.J., Yeung A.T., Pena O.M., Hancock R.E. 2012. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. *Current Pharmaceutical Design* 18 (6): 807–819. <https://doi.org/10.2174/138161212799277617>
- Ageitos J.M., Sánchez-Pérez A., Calo-Mata P., Villa T.G. 2017. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology* 133 (6): 117–138. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.018>
- Baskova I.P., Zavalova L.L., Basanova A.V., Sass A.V. 2001. Separation of monomerizing and lysozyme activities of destabilase from medicinal leech salivary gland secretion. *Biochemistry* 66: 1368–1373. <https://doi.org/10.1023/A:1013333829196>
- Beschin A., Bilej M., Brys L., Torreele E., Lucas R., Magez S., De Baetselier P., 1999. Convergent evolution of cytokines. *Nature* 400: 627–628. <https://doi.org/10.1038/23164>
- Boidin-Wichlacz C., Vergote D., Slomianny C., Jouy N., Salzet M., Tasiemski A. 2012. Morphological and functional characterization of leech circulating blood cells: role in immunity and neural repair. *Cellular and Molecular Life Science* 69 (10): 1717–1731. DOI 10.1007/s00018-011-0897-x
- Bowdish D.M.E., Hancock R.E.W. 2005. Anti-endotoxin properties of cationic host defence peptides and proteins. *Journal of Endotoxin Research* 11 (4): 230–236. <https://doi.org/10.1177/2F09680519050110040801>
- Brogden K.A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3 (3): 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>

- Bruno R., Maresca M., Canaan S., Cavalier J.F., Mabrouk K., Boidin-Wichlacz C., Olleik H., Zeppilli D., Brodin P., Massol F., Jollivet D., Jung S., Tasiemski A. 2019. Worms' antimicrobial peptides. *Marine Drugs* 17: 512. <https://doi.org/10.3390/md17090512>
- Bulet P., Stöcklin R. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters* 12 (1): 3–11. <https://doi.org/10.2174/0929866053406011>
- Burrell B.D., Sahley C.L., Muller K.J. 2003. Progressive recovery of learning during regeneration of a single synapse in the medicinal leech. *Journal of Comparative Neurology* 457: 67–74. <https://doi.org/10.1002/cne.10530>
- Cho J.H., Park C.B., Yoon Y.G., Kim S.C. 1998. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: Purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease* 1408 (1): 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(98\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(98)00058-1)
- Cooper E.L., Cossarizza A., Suzuki M.M., Salvioli S., Capri M., Quaglino D., Franceschi C. 1995. Autogeneic but not allogeneic earthworm effector coelomocytes kill the mammalian tumor cell target K562. *Cellular Immunology* 166: 113–122. <https://doi.org/10.1006/cimm.1995.0013>
- Cooper E.L., Kauschke E., Cossarizza A. 2001. Annelid humoral immunity: cell lysis in earthworms. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 484: 169–183. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1291-2_15
- Cossarizza A., Cooper E.L., Quaglino D., Salvioli S., Kalachnikova G., Franceschi C. 1995. Mitochondrial mass and membrane potential in coelomocytes from the earthworm *Eisenia foetida*: studies with fluorescent probes in single intact cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214 (2): 503–510. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2315>
- Davidson D.J., Currie A.J., Reid G.S.D., Bowdish D.M.E., MacDonald K.L., Ma R.C., Hancock R.E.W., Speert D.P. 2004. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *Journal of Immunology*, 172 (2): 1146–1156. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1146>
- de Eguileor M., Grimaldi A., Tettamanti G., Valvassori R., Cooper E.L., Lanzavecchia G. 2000. Different types of response to foreign antigens by leech leukocytes. *Tissue and Cell* 32 (1): 40–48. <https://doi.org/10.1054/tice.1999.0085>
- de Eguileor M., Tettamanti G., Grimaldi A., Congiu T., Ferrarese R., Perletti G., Valvassori R., Cooper E.L., Lanzavecchia G. 2002. Leeches: immune response, angiogenesis and biomedical applications. *Current Pharmaceutical Design* 9: 133–147 <https://doi.org/10.2174/1381612033392198>
- Dhainaut A., Scaps P. 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Canadian Journal of Zoology* 79: 233–253. <https://doi.org/10.1139/z00-196>
- Dinarello C.A. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118 (2): 503–508. <https://doi.org/10.1378/chest.118.2.503>
- Ding A., Shi H., Guo Q., Liu F., Wang J., Cheng B., Wei W., Xu C. 2019. Gene cloning and expression of a partial sequence of Hirudomacin, an antimicrobial protein that is increased in leech (*Hirudo nipponica* Whitman) after a blood meal. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 231: 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.02.005>
- Dubin A., Mak P., Dubin G., Rzychon M., Stec-Niemczyk J., Władyka B., Maziarka K., Chmiel D. 2005. New generation of peptide antibiotics. *Acta Biochimica Polonica* 52 (3): 633–638. http://www.actabp.pl/#File?./html/3_2005/633.html
- Hanusova R., Bilej M., Brys L., De-Baetselier P., Beschin A. 1999. Identification of a coelomic mitogenic factor in *Eisenia foetida* earthworm. *Immunology Letters* 65 (3): 203–211. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(98\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(98)00111-4)
- Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A.Jr., Ezekowitz R.A.B. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313–1318. DOI: 10.1126/science.284.5418.1313
- Huerta-Cantillo J., Navarro-García F. 2016. Properties and design of antimicrobial peptides as potential tools against pathogens and malignant cells. *Investigación en Discapacidad*, 5 (2): 96–115. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2016/ir162d.pdf>
- Hultmark D., Engström Å., Andersson K., Steiner H., Bennich H., Boman H. 1983. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *The EMBO Journal* 2: 571–576. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01465.x>
- Jung S., Sönnichsen F.D., Hung C.-W., Tholey A., Boidin-Wichlacz C., Haeusgen W., Gelhaus C., Desel C., Podschun R., Waetzig V., Tasiemski A., Leippe M., Grötzinger J. 2012. Macin family of antimicrobial proteins combines antimicrobial and nerve repair activities. *Journal of Biological Chemistry* 287: 14246–14258. doi: 10.1074/jbc.M111.336495
- Kauschke E., Pagliara P., Stanbili L., Cooper E.L. 1997. Characterization of proteolytic activity in coelomic fluid of *Lumbricus terrestris* (Annelida, Lumbricidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 116 (2): 235–242. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(96\)00248-9](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(96)00248-9)

- Kaygorodova I.A. 2012. A revised checklist of the Lake Baikal Hirudinida fauna. *Lauterbornia* 75: 49–62.
- Kaygorodova I.A., Bolbat N.B, Bolbat A.V. 2020. Species delimitation through DNA barcoding of freshwater leeches of the *Glossiphonia* genus (Hirudinea: Glossiphoniidae) from Eastern Siberia, Russia. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* (in press) <https://doi.org/10.1111/jzs.12385>
- Kaygorodova I.A., Dzyuba E.V., Pronin N.M. 2012. Leech-like parasites (Clitellata, Acanthobdellida) infecting native and endemic Eastern Siberian salmon fishes. *The Scientific World Journal* 2012: 652827. <https://doi.org/10.1100/2012/652827>
- Kaygorodova I.A., Sherbakov D. Yu. 2006. Molecular phylogenetic study of systematic position of Baikalian oligochaetes in Clitellata. *Russian Journal of Genetics* 42 (12): 1390–1397. <https://doi.org/10.1134/S1022795406120052>
- Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J.E. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10: 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Lassegues M., Milochau A., Doignon F., Du Pasquier L., Valembois P. 1997. Sequence and expression of an *Eisenia fetida*-derived cDNA clone that encodes the 40-kDa fetidin antibacterial protein. *European Journal of Biochemistry* 246 (3): 756–762. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00756.x>
- Lefebvre C., Cocquerelle C., Vandenbulcke F., Hot D., Huot L., Lemoine Y., Salzet M. 2004. Transcriptomic analysis in the leech *Theromyzon tessulatam*: involvement of cystatin B in innate immunity. *Biochemical Journal* 380 (3): 617–625. <https://doi.org/10.1042/bj20040478>
- Lohner K. 2001. The role of membrane lipid composition in cell targeting of antimicrobial peptides. In: Lohner K., (ed.) *Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies*. Wymondham, Norfolk, Horizon Scientific Press, 149–165
- Loker E.S., Adema C.M., Zhang S.M., Kepler T.B. 2004. Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews* 198 (1): 10–24. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x>
- Macagno E.R., Gaasterland T., Edsall L., Bafna V., Soares M.B., Scheetz T., Casavant T., Da Silva C., Wincker P., Tasiemski A., Salzet M. 2010. Construction of a medicinal leech transcriptome database and its application to the identification of leech homologs of neural and innate immune genes. *BMC Genomics* 11: 407. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-407>
- Macke E., Tasiemski A., Callens M., Decaestecker E., Massol F. 2017. Life history and eco-evolutionary dynamics in light of the gut microbiota. *Oikos* 126 (4): 508–531. <https://doi.org/10.1111/oik.03900>
- Mangoni M.L., Shai Y. 2009. Temporins and their synergism against Gram-negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1788 (8): 1610–1619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.021>
- McDougall C., Hui J.H.L., Monteiro A., Takahashi T., Ferrier D.E.K. 2008. Annelids in evolutionary developmental biology and comparative genomics. *Parasite*, 15 (3): 321–328. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153321>
- Milochau A., Lassegues M., Valembois P. 1997. Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology* 1337 (1): 123–132. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(96\)00160-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(96)00160-4)
- Mookherjee N., Hancock R.E.W. 2007. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (7-8): 922–933. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6475-6>
- Muniz L.R., Knosp C., Yeretsian G. 2012. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Frontiers in Immunology* 3: 310. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00310>
- Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W., Goździcka-Józefiak A. 2014. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica* 59 (3): 181–196. DOI: 10.1007/s12223-013-0280-4
- Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology* 29 (9): 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Nicolas P. 2009. Multifunctional host defense peptides: intracellular targeting antimicrobial peptides. *The FEBS Journal* 276 (22): 6483–6496. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07359.x>
- Nissen-Meyer J., Nes I.F. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbiology* 167 (2-3): 67–77. <https://doi.org/10.1007/s002030050418>
- Ovchinnikova T.V., Aleshina G.M., Balandin S.V., Krasnodembskaya A.D., Markelov M.L., Frolova E.I., Leonova Y.F., Tagaev A.A., Krasnodembsky E.G., Kokryakov V.N. 2004. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina*. *FEBS Letters* 577 (1-2): 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.012>

- Pantelev P.V., Tsarev A.V., Bolosov I.A., Paramonov A.S., Marggraf M.B., Sychev S.V., Shenkarev Z.O., Ovchinnikova T.V. 2018. Novel Antimicrobial Peptides from the Arctic Polychaeta *Nicomache minor* Provide New Molecular Insight into Biological Role of the BRICHOS Domain. *Marine Drugs* 16 (11): 401. <https://doi.org/10.3390/md16110401>
- Pasupuleti M., Schmidtchen A., Malmsten M. 2012. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology* 32 (2): 143–171. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>
- Perin J., Jolles P. 1972. The lysozyme from *Nephtys hombergi* (annelid). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure* 263 (3): 683–689. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(72\)90051-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(72)90051-7)
- Pfeiffer I., Brenig B., Kutschera U. 2005. Molecular phylogeny of selected predaceous leeches with reference to the evolution of body size and terrestriality. *Theory in Biosciences* 124 (1): 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.tbio.2005.05.002>
- Ponnappan N., Budagavi D.P., Yadav B.K., Chugh A. 2015. Membrane-active peptides from marine organisms-antimicrobials, cell-penetrating peptides and Peptide toxins: applications and prospects. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 7 (1): 75–89. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9182-2>
- Prochazkova P., Roubalova R., Dvorak J., Navarro Pacheco N.I., Bilej M. 2020. Pattern recognition receptors in annelids. *Developmental & Comparative Immunology* 102: 103493. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103493>
- Quaglino D., Cooper E.L., Salvioli S., Capri M., Suzuki M.M., Ronchetti I.P., Franceschi C., Cossarizza A. 1996. Earthworm coelomocytes *in vitro*: cellular features and “granuloma” formation during cytotoxic activity against the mammalian tumor cell target K562. *European Journal of Cell Biology* 70 (3): 278–288.
- Salzet M., Capron A., Stefano G. 2000. Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions. *Parasitology Today*, 16 (12): 536–540. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01787-7](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01787-7)
- Salzet M., Tasiemski A., Cooper E. 2006. Innate Immunity in Lophotrochozoans: The Annelids. *Current Pharmaceutical Design* 12(24): 3043–3050. <https://doi.org/10.2174/13816120677947551>
- Sawyer R. 1986. *Leech biology and behavior, Vol. II. Feeding Biology, Ecology, and Systematics*. Suffolk, Clarendon Press, Oxford, 793 p.
- Schikorski D., Cuvillier-Hot V., Leippe M., Boidin-Wichlacz C., Slomianny C., Macagno E., Salzet M., Tasiemski A. 2008. Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *Journal of Immunology* 181 (2): 1083–1095. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1083>
- Silver A.C., Graf J. 2011. Innate and procured immunity inside the digestive tract of the medicinal leech. *Invertebrate Survival Journal* 8 (2): 173–178. <http://www.isj.unimo.it/index.php/ISJ/article/view/246>
- Singh A.P. 2010. Medicinal leech therapy (Hirudotherapy): a brief overview. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 16 (4): 213–215. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2009.11.005>
- Sket B., Trontelj P. 2008. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 129–137. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9010-8>
- Suzuki M.M., Cooper E.L. 1995. Allogeneic killing by earthworm effector cells. *Natural Immunity* 14 (1): 11–19.
- Tasiemski A., Jung S., Boidin-Wichlacz C., Jollivet D., Cuvillier-Hot V., Pradillon F., Vetriani C., Hecht O., Sönnichsen F.D., Gelhaus C., Hung C.W., Tholey A., Leippe M., Grötzinger J., Gaill F. 2014. Characterization and function of the first antibiotic isolated from a vent organism: the extremophile metazoan *Alvinella pompejana*. *PLoS ONE* 9: e95737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095737>
- Tasiemski A., Massol F., Cuvillier-Hot V., Boidin-Wichlacz C., Roger E., Rodet F., Fournier I., Thomas, F., Salzet M. 2015. Reciprocal immune benefit based on complementary production of antibiotics by the leech *Hirudo verbana* and its gut symbiont *Aeromonas veronii*. *Scientific Reports* 5: 17498. <https://doi.org/10.1038/srep17498>
- Tasiemski A., Salzet M. 2010. Leech immunity: from brain to peripheral responses. In: Söderhäll K. (ed.) *Invertebrate Immunity. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA., Springer., Vol 708, 80–104. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_5
- Tasiemski A., Vandenbulcke F., Mitta G., Lemoine J., Lefebvre C., Sautiere P.E., Salzet M. 2004. Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 30973–30982. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312156200>
- Trontelj P., Sket B., Steinbrück G. 1999. Molecular phylogeny of leeches: Congruence of nuclear and mitochondrial rDNA data sets and the origin of bloodsucking. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 37 (3): 141–147. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.1999.00114.x>
- Tučková L., Rejnek J., Bilej M., Pospišil R. 1991. Characterization of antigen-binding protein in earthworms *Lumbricus terrestris* and *Eisenia foetida*. *Developmental & Comparative Immunology* 15 (4): 263–268. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(91\)90019-U](https://doi.org/10.1016/0145-305X(91)90019-U)

- Wiesner J., Vilcinskas A. 2010. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 1(5): 440–464. <https://doi.org/10.4161/viru.1.5.12983>
- Wu W.K., Wong C.C., Li Z.J., Zhang L., Xiang S.X., Cho C.H. 2010. Cathelicidins in inflammation and tissue repair: Potential therapeutic applications for gastrointestinal disorders. *Acta Pharmacologica Sinica* 31 (9): 1118–1122. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.117>
- Yang S.C., Lin C.H., Sung C.T., Fang J.Y. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology* 5: 241. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>
- Yeaman M.R., Yount N.Y. 2007. Unifying themes in host defence effector polypeptides. *Nature Reviews Microbiology* 5: 727–740. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1744>
- Zairi A, Tangy F, Bouassida K., Hani K. 2009. Dermaseptins and magainins: antimicrobial peptides from frogs' skin-new sources for a promising spermicides microbicides-a mini review. *BioMed Research International* 2009: 452567. <https://doi.org/10.1155/2009/452567>
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- Zhang L.J., Gallo R.L. 2016. Antimicrobial peptides. *Current Biology* 26 (1): R14–19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>
- Zhang M., Zhao J., Zheng J. 2014. Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides. *Soft Matter* 10 (38): 7425–7451. <https://doi.org/10.1039/C4SM00907J>

THE ROLE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDS IN THE IMMUNITY OF PARASITIC LEECHES (ANNELIDA, HIRUDINEA)

I. A. Kaygorodova

Keywords: parasitic leeches, immunity, antimicrobial peptides

SUMMARY

Antimicrobial proteins and peptides (AMPs), essential components of the immune system, represent a diverse class of natural molecules produced by all living organisms in response to pathogen attacks. AMPs can possess a wide range of antibiotic activity against foreign and opportunistic bacteria, fungi, and viruses. AMPs play an important role in the selection of colonizing bacterial symbionts, which helps multicellular organisms to cope with certain environmental problems. AMPs are especially important for invertebrates due to the absence of an adaptive immune system. Although many AMPs have similar physical and chemical properties (common total length varying from 10 to 100 amino acids, total positive charge, or high cysteine content), their immunomodulatory activity is specific for each AMP type. The present review summarizes current state of knowledge on leech immunity, with emphasis on the special role of AMPs, and indicates the wide variety of primary AMP structures, which seems to correlate with a variety of life strategies and ecology of ectoparasites.

УДК 636.093

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТЕЙЛЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2021 г. С. А. Бурсаков*

Институт инновационных биотехнологий в животноводстве (ИИБЖ) –
филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста),
ул. Костякова, д. 12, стр. 4, Москва, 127422 Россия
*e-mail: sergeyoscu@gmail.com

Поступила в редакцию 01.10.2020 г.

После доработки 30.10.2020 г.

Принята к печати 02.11.2020 г.

В данной работе представлены современные подходы для молекулярной диагностики *Theileria* spp. Обнаружение и лечение тейлериоза – заболевания, вызываемого этими простейшими, являются необходимым инструментом для его контроля. Важность точной идентификации возбудителя для эпидемиологических исследований и диагностических целей определяется тяжестью заболевания и разной восприимчивостью к лекарственным препаратам. Эти работы должны вестись с учетом видоспецифических свойств и широкого разнообразия видов *Theileria*, а также особенностей их позвоночных хозяев и членистоногих векторов. Пополнение баз данных сиквенсами новых *Theileria* является стимулом для создания ПЦР тест-систем, которые дают возможность определять одновременно несколько видов и регистрировать коинфекцию. Современные средства контроля за выявлением и распространением заболевания не всегда позволяют вовремя распознать его на ранних стадиях, что при высокой скоротечности болезни может приводить к потерям в животноводстве. Отсюда возникает интерес к быстрым и чувствительным методам обнаружения на ранних стадиях развития заболевания.

Ключевые слова: *Theileria*, тейлериоз, крупный рогатый скот, молекулярная диагностика

DOI: 10.31857/S0031184721010038

Тейлериоз крупного рогатого скота (КРС) является трансмиссивным заболеванием, вызываемым тейлериями – облигатными простейшими паразитами, относящимися к типу Apicomplexa, порядку Piroplasmida, семейству Theileriidae, род *Theileria*. Вследствие потерь молочной и мясной продуктивности и гибели скота - это кровепаразитарное заболевание может наносить значительный экономический ущерб животноводству.

Возбудители *Theileria* spp. специфичны для разных видов и поражают как диких, так и домашних животных. Идентифицировано несколько видов *Theileria* spp., паразитирующих у крупного рогатого скота (КРС): *Theileria parva*, *T. annulata*, *T. buffeli/orientalis*, *T. mutans*, *T. velifera*, *T. sergenti*, *T. taurotragi* и *T. orientalis*. Наиболее пато-

генными являются *T. parva* и *T. annulata*, которые отличаются высокой летальностью и индуцируют трансформацию инфицированных клеток лимфоцитов или макрофагов / моноцитов (Nene, 2016). Другие виды тейлерий не вызывают неконтролируемой пролиферации инфицированных лейкоцитов, а вместо этого размножаются преимущественно в инфицированных эритроцитах.

Наиболее патогенными возбудителями заболевания мелких жвачных животных, имеющими экономическое значение, являются *Theileria lestoquardi* (*T. hirci*), которая вызывает злокачественный тейлериоз овец, а также *Theileria uilenbergi* и *Theileria luwenshuni*. Помимо пород КРС и мелкого рогатого скота, к этому заболеванию восприимчивы также буйволы.

Источником инвазии являются больные животные и тейлерионосители. Состояние носительства для пироплазмиды характеризуют как долгосрочное сохранение паразита в его хозяине. Возможность передачи другим хозяевам через векторную инфекцию для поддержания цикла передачи также является его неотъемлемой частью. Долгосрочная устойчивость подразумевает, что паразит может поддерживаться и распространяться в позвоночном хозяине, избегая иммунной системы. Считается, что после заражения животные могут пожизненно оставаться носителями тейлерии (de Waal, 1992).

Тейлериоз выявлен во многих странах Западной Европы, Азии, Африки, в странах Средней Азии. Территория Российской Федерации считается благополучной по тейлериозу, и соответственно данные по распространению этого заболевания у КРС на территории РФ ограничены. Очаги распространения расположены в основном на юге России. Однако вспышки тейлериоза фиксировали во многих регионах Российской Федерации, в Ростовской области, Дагестане, на Дальнем востоке, в Московской области и др. (Самойловская и др., 2015; Bursakov, Kovalchuk, 2019). Поэтому оценка степени распространения и своевременная диагностика играют решающую роль в предотвращении случаев заболеваемости, особенно в связи с увеличением и изменением ареала распространения клещей, которые переносят, в частности, возбудителей данной болезни.

Тейлерия на территории РФ передается различными видами клещей, в том числе иксодовыми клещами *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus*, *Boophilus annulatus*, *Hyalomma anatolicum*, *H. detritum*, *Haemaphysalis punctate* и *H. sulcate* (Зубаринова и др., 2017; Новак и др., 2019; Florin-Christensen et al., 2009), нападающими на животных во всех активных фазах развития. Биотопами этих насекомых являются степные и предгорные целинные пастбища. Поскольку клещи перезимовывают в помещениях, то не исключена возможность заболевания скота тейлериозом не только в пастбищный, но и в стойловый период. Сезонность и динамика тейлериоза определяются видовым составом и биологическими особенностями переносчиков, а также погодными условиями. Максимальное количество больных животных регистрируют обычно в июне-июле, что связано с высокой активностью имаго клещей-переносчиков.

В связи с меняющимися условиями климата и повышением среднегодовой температуры на Земле ареал распространения клещей смещается ближе к северу, что в свою очередь может ухудшать в этих регионах эпизоотологическую обстановку по тейлериозу КРС (Tokarevich et al., 2017).

Описаны только 91 генотип и ~ 40 видов *Theileria* spp. среди ~6000 известных видов *Apicomplexa*, составляющих лишь 0.1% от предполагаемого числа присутствующих на Земле видов *Apicomplexa* (1.2–10 млн.) (Morrison, 2009). В связи с таким обширным генетическим разнообразием *Theileria* spp. в природных популяциях необходима разра-

ботка специфичных анализов или зондов для географически разнообразных популяций (Gubbels et al., 2000; Chaisi et al., 2013; Perera et al., 2015). Соответственно, для совершенствования методов молекулярной диагностики с использованием универсальных праймеров и/или зондов, совершенно необходимо пополнение базы данных *Theileria* и *Apicomplexa* новыми видами.

Поэтому в данном обзоре представлены молекулярные методы, используемые в практике идентификации тейлериоза.

Диагностика тейлериоза

Традиционный метод выявления возбудителей у инфицированных животных микроскопическое исследование мазков крови, окрашенных по Гимзе, по-прежнему является самыми дешевым и быстрым методом, используемым для идентификации паразитов *Theileria*. Метод подходит для выявления острых инфекций, но не для обнаружения животных-носителей, у которых паразитемия может быть низкой, поскольку их чувствительность и специфичность ограничены (Altaу et al., 2008).

Однако, помимо прямого микроскопического исследования, тейлериоз может быть диагностирован путем идентификации инфекционного возбудителя с помощью серологических тестов с использованием флуоресцентных антител, культуры *in vitro* и инокуляции животных, а также с помощью молекулярно-диагностических анализов на базе нуклеиновых кислот (Mans, 2015; Lampereur et al., 2017; Sivajothi, Reddy, 2018; Gebrekidan et al., 2020).

Серологические методы диагностики – реакция связывания комплимента (РСК), реакция длительного связывания комплимента (РДСК), реакция иммунофлуоресценции (РИФ) с антигеном, приготовленным из «гранатных тел» или эритроцитарных форм тейлерий, – используют для ранней диагностики субклинических инфекций в эпидемиологических исследованиях и установления тейлерионосительства. Они помогают обнаружить антитела к *Theileria* у выздоровевших животных или животных, прошедших вакцинацию, используя антигены шизонта, приготовленные в культуре клеток печени экспериментально зараженного животного (BurrIDGE et al., 1974). Перекрестные реакции генетически близких видов или ослабление специфических иммунных ответов приводят к появлению ложноположительных и ложноотрицательных результатов, уменьшающих использование непрямого стандартного метода флуоресцирующих антител (нМФА). Разработка антиген-специфических анализов не решает эту проблему, так как близкородственные виды могут иметь аналогичные антигены. Тем не менее лишённые высокой специфичности серологические анализы остаются важной составляющей в эпидемиологических исследованиях за счет своей экспрессности и простоты (Li et al., 2020). Поэтому продолжают разрабатываться новые иммунологические методы, предлагающие более быстрые, более чувствительные и более специфичные варианты, чем традиционные методы, хотя прямая иммунологическая диагностика паразитарных антигенов в ткани хозяина все еще отсутствует.

Молекулярная диагностика тейлериоза

Методы обнаружения *Theileria* spp. на основе идентификации нуклеиновых кислот и их амплификации являются наиболее чувствительными, специфичными, надежными и доступными в настоящее время. Эти методы быстры, свободны от иммунокомпетентности и позволяют различать морфологически сходных паразитов. Молекулярные методы с улучшенной чувствительностью и специфичностью, например анализ гибридизации

ДНК, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ее модификаций, обеспечивают детекцию инфекции в скрытой фазе заболевания. Количество таких диагностических анализов, целью которых является выявление специфических генов и видов, экспоненциально возрастает (Criado-Fornelio, 2007). Для большинства экономически важных *Theileiria* spp., таких как *T. annulata*, *T. equi*, *T. lestoquardi*, *T. parva*, *T. uilenbergi* и других, менее опасных видов существует широкий спектр диагностических тестов, чему способствовало секвенирование геномов представителей ряда возбудителей: *T. orientalis* Shintoku (Hayashida et al., 2012), *T. equi* WA (Kappmeyer et al., 2012), *T. annulata* Ankara (Pain et al., 2005) и *T. parva* Muguga (Gardner et al., 2005) (данные геномов доступны в банке данных пироплазм, который является частью Eukaryotic Pathogen Bioinformatic Resource (EuPathDB) <http://eupathdb.org>).

Для обнаружения *Theileria* spp. у позвоночных и клещей-хозяев описано несколько вариантов анализов ПЦР и ПЦР в реальном времени, которые более чувствительны, чем микроскопический метод и в зависимости от мишени и размера гена могут позволить выполнить идентификацию на уровне рода или вида. Тест-системы для *Theileria* spp. на базе ДНК основаны на следующих методах: классическая, или традиционная ПЦР с последующим электрофоретическим анализом агарозного геля (Bishop et al., 1992; Pienaar et al., 2011; Wang et al., 2018), вложенная-PCR (Odongo et al., 2010), мультиплексная ПЦР (Kundave et al., 2018); ПЦР в реальном времени (Jeong et al., 2003; Kim et al., 2008; Sibeko et al., 2008; Pienaar et al., 2011b, 2014); ПЦР-анализ в реальном времени с использованием SYBR green (Pienaar et al., 2013); ПЦР-полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) (Bishop et al., 1992; Geysen et al., 1999; Heidarpour Vami et al., 2009; Zaeemi et al., 2011); ПЦР с последующим точечным блоттингом, капиллярным или слот-блоттингом и гибридизацией с использованием радиоизотопно-меченых зондов (Bishop et al., 1992; Allsopp et al., 1993; Collins et al., 2002; Skilton et al., 2002) или хемилюминесценцией (гибридизация методом обратного блоттинга ПЦР-RLB) (Gubbels et al., 1999; Schnittger et al., 2004); петлевая изотермическая амплификация (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) (Alhassan et al., 2007; Thekisoe et al., 2010; Wang et al., 2010; Salih et al., 2012; El-Ashker et al., 2015; Shirozu et al., 2020); анализы на основе резонансной передачи энергии Форстера (Förster resonance energy transfer - FRET) (Chaisi et al., 2013; Perera et al., 2015; Yang et al., 2014) и анализ кривых плавления с высоким разрешением (HRM-анализ, High Resolution Melting) (Salim et al., 2013; Wang et al. 2020).

Молекулярные методы выявляют геномный материал паразитов (указывают на присутствие их живых форм у животного в момент отбора проб) являются эффективным инструментом наблюдения за здоровьем животных и выявления различных заболеваний. Методы, начиная от традиционной ПЦР до вложенной-ПЦР и до ПЦР в реальном времени, позволяют улучшить чувствительность, достоверность количественной оценки и повысить скорость обнаружения. При этом такие методы как RLB, анализы с использованием резонансной передачи энергии пан-Форстера и анализ плавления с высоким разрешением гарантируют выявление множества видов или генотипов одновременно.

Комплексные подходы для детектирования, например, нескольких видов *Theileria* spp. или *Babesia* spp. одновременно в одном анализе (Allsopp et al., 1993) интересны тем, что позволяют обходиться без проведения независимых реакций ПЦР для каждого возбудителя заболевания. Метод RLB, например, объединяет родоспецифичную ПЦР с гибридизацией с мембраносвязанным видоспецифичным олигонуклеотидом для дифференциального обнаружения известных видов *Theileria* spp. и *Babesia* spp. на основе их различий в последовательностях гена 18S субъединицы рРНК (Gubbels et al., 1999).

ПЦР анализ на основе профилей в реальном времени имеет преимущество в том, что изменение зонда может быть установлено по различиям в профилях плавления, которые могут быть связаны с генотипическими или видовыми различиями. Кроме того, ПЦР в реальном времени позволяет дать количественную оценку ДНК, указывая долю каждого рода или вида в данном образце (Bott et al., 2009).

Метод петлевой изотермической амплификации LAMP для работы в изотермических условиях (в диапазоне температур от 60 до 65 °С) и без использования специализированного оборудования может быть применен в полевых условиях (Notomi et al., 2000). Технология LAMP позволяет визуально обнаруживать продукты амплификации путем добавления флуоресцентных красителей, таких как SYBR Green, и измерения мутности. LAMP примерно в десять раз более чувствителен по сравнению с традиционной ПЦР. Кроме того, реакцию можно проводить без необходимости выделения ДНК.

В табл. 1 приведены праймеры, использованные для определения и идентификации *Theileria* spp., специфичных для рода и видов. Молекулярные мишени включают ген 18S rRNA, CoxIII, Tams1, ITS, GAPDH, ama1, hp1, MPSP. Благодаря консервативной природе и повторяющемуся расположению в геноме, ген ядерной рибосомной 18S рРНК, обеспечивает достаточное количество матричной ДНК для ПЦР и часто используются для идентификации видов (Chae et al., 1998; Katzer et al., 1998). Он является наиболее часто используемым геном-мишенью. Несмотря на высокую степень межвидовой консервативности гена 18S рРНК *Theileria* spp., особенно при работе с новыми организмами, его необходимо амплифицировать и секвенировать полностью (Herwaldt et al. 2003), чтобы идентифицировать все генетические вариации.

Видоспецифичные молекулярные методы используются для диагностических целей, а также при проведении эпидемиологических исследований распространения конкретных видов *Theileria* spp. В случае подозрения на присутствие этих видов, когда видоспецифичные анализы не дают результатов либо пироплазма не может быть идентифицирована, целесообразно проведение анализов, специфичных для всего рода. Примером может служить диагностика *T. annulata* по гену Tams1, кодирующему основной полипептид на поверхности мембраны пироплазмы на стадии мерозоиота. Из-за высокого уровня внутригенной вариабельности, праймеры на Tams1 могут не обнаруживать все генотипы *T. annulata*, что может привести к недооценке распространенности этого патогена (Kirvar et al., 2000; Katzer et al., 2006, Santos et al., 2013). В таких случаях обычно используют полный анализ последовательности гена 18S рРНК.

ПЦР в реальном времени способствовала более широкому распространению ПЦР из-за ее повышенной скорости, чувствительности, воспроизводимости и снижения риска загрязнения. Примером может служить количественный анализ ПЦР в реальном времени на основе гена cox III с использованием анализа кривой плавления при смешанных инфекциях (Chaisi et al., 2013), позволяющий обнаруживать и идентифицировать одновременно многие виды *Theileria* (*T. parva*, *T. taurotragi*, *T. buffeli*, *T. mutans*, *T. velifera*). Анализ Cox III специфичен для детекции инфекций *T. parva* у КРС и буйволов и выявляет больше положительных образцов этих возбудителей, чем анализ RLB и анализ 18S рРНК. Однако низкий уровень выявления гена cox III объясняется наличием обширных межвидовых и внутривидовых вариаций в областях последовательностей присоединения зондов. Другим примером может служить метод ПЦР в реальном времени, для диагностики и количественного определения *T. sergenti* с использованием специфического праймера для гена 33 кДа (Jeong et al., 2003). FRET-qPCR пан-*Theileria* позволяет обнаружить все известные *Theileria* spp. жвачных животных в одной реакции (Yang et al., 2014).

Таблица 1. Дизайн праймеров ПЦР для детектирования *Apicomplexa*, *Theileria* / *Babesia* и *Theileria* spp.
Table 1. Design of PCR primers for the detection of *Apicomplexa*, *Theileria* / *Babesia* and *Theileria* spp.

Организм	Ген-мишень, метод ПЦР	Размер ампликона (пн)	Праймеры (5'-3')	Источник
<i>Apicomplexa</i>	18S rRNA, традиционный	1700	КриптоF: AACCTGGTTGATCCTGCCAGT КриптоR: GCTTGATCCTTCGACAGGTTCACTAC	Herwaldt et al., 2003
<i>Theileria</i> / <i>Babesia</i> spp.	18S rRNA, традиционный	1700	Nbab 1F: AAGCCATGCATGTCTAAAGTATAAGCTTTT TB18S-Rev: CCGTCTCCGGAAATCGAACC	Oosthuizen et al., 2008
<i>Theileria</i> spp./ <i>Babesia</i> spp.	18S rRNA, RLB-ПЦР	460-520	RLB-F: GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATA RLB-R: biotin-5'-TCTTCGATCCCTAACTTTC	Gubbels et al., 1999
<i>Theileria</i> / <i>Babesia</i> spp.	18S rRNA, вложенный RLB	389-426	RLB-F: GACAAGAATAACAATACRGGGC CCTAACTTTCGTTCTTGATTA	Schnittger et al., 2004
<i>Theileria</i> spp.	18S rRNA, традиционный	1100	F: AGTTTCTGACCTATCAG R: TTGCCTTAAACTTCCTTG	Allsopp et al., 1993
<i>Theileria</i> spp.	18S rRNA, традиционный; ПЦР в реальном времени	230	F: GGTAATCCAGTCCCAATAG R: ACCAACAATAAGAACCAAGTC anchor: AGAAAATTAGAGTGCTCAAAGCAG GCTTT-FL sensor: LCRred705-GCC TTGAATA GTTTAGCATGGAAT-PR	Sibeko et al., 2008
<i>Theileria</i> spp.	<i>cox</i> III; вложенный ПЦР в реальном времени	980	F3Cox: AAGATGAATCCGATTTTGATGA MJCoxF3: AAATGGACTATGTAAAGTTAAACCTAT FCox: CAACATTTTAAAGCTATCCAA nRCox: TTATAGTACAGGATTAAGATAC	Chaisi et al., 2013
<i>Theileria</i> spp.	18S rRNA, FRET-ПЦР в реальном времени	680	Anchor probe: Cox1-6FAM ATTGGaigacattATtTctatatttaaCaGGAc Sensor probe: Cox1-Cy5-AttaCgTatgtCggaag capital letters is locked nucleic acids F: TAGTGACAAAGAAATAACAATACGGGGCT R: CAGCAGAAAATCAAACCTACGAGCTTTTAACT	Yang et al., 2014
			Anchor probe: CCAATTGATACTTGGAAAGAGGTTT-(6-FAM) Reporter probe: (LCRred640)-AATTCCCATCATTCCAATTACAAGAC-phosphate	

Таблица 1. Продолжение
Table 1. Continuation

Организм	Ген-мишень, метод ПЦР	Размер ампликона (пн)	Праймеры (5'-3')	Источник
<i>Theileria</i> spp.	18S rRNA, TaqMan-ПЦР в реальном времени	147	F: ATTGTTGCAGTTAAAAAGTCTCGTA R: GCAAAAAGCCTGCTTTGAGCAC TaqMan probe L1: FAM-TTCGGACGGAGTTCGGC+T+TG-BBQ	Papli et al., 2011
<i>T. annulata</i>	Tams1, традиционный	430	F: CCAGGACSSCCSTCSAAGTTC R: GCATCTAGTTCSTTGGCGGA	Kundave et al., 2015
<i>T. annulata</i>	ITS, традиционный	637 (623-643)	F: TTATTCGGACCGTGAATG R: CATCCACCCTGAAAAGT	Zhou et al., 2016
<i>T. annulata</i>	Tams1-1, вложенный ПЦР	721 453	F: GTAACCTTTAAAAACCGT R: GTTACGAAACATGGGTTT nF:CACCTCAAAAACATACSSCC nR:TGACSSCACTTATCGTCC	Martin-Sanchez et al., 1999
<i>T. annulata</i>	Tams1, традиционный; ПЦР в реальном времени	319	Tams1F: CCAATTCGAGACCTACTACGATG Tams1R: CCACTRTCGTCCCTAAGCTCG	Santos et al., 2013
<i>T. annulata</i>	18S rRNA, ПЦР в реальном времени	99	F: TTCGATGGTAGTCGGTGTGC R: TTGGATGTGGTAGCCCGTTTCT	Zhao et al., 2016
<i>T. annulata</i>	ПЦР в реальном времени GAPDH;	100	F: GATGGTGAAGGTCCGGAGTGAAC R: GTCATTGATGGCGACCGATGT	Zhao et al., 2016
<i>T. parva</i>	ПЦР в реальном времени ama1,	2089	F: GGAGCTAACTCTGACCCCTTCG R: CCAAAAGTAGGCCAAATACGGC	Gotia et al., 2016
<i>T. parva</i>	традиционный hprt1,	1221	F: CCAGCCGGCTACGTTATGG R: CACCAGAAATGATCTGAACAAGCA	Gotia et al., 2016

<i>T. parva</i>	amaI, ПЦР в реальном времени	127	F: GCCCTTACAAGCCTTAGCTC R: GTTCGGGTGGCTTCTGGTC	Gotia et al., 2016
<i>T. parva</i>	hprt1, ПЦР в реальном времени	101	F: GTTCTGTGGCCAGCTGCTTA R: AGAGTTCGGGAAATGCAGCAA	Gotia et al., 2016
<i>T. parva</i>	18S rRNA, ПЦР в реальном времени	167	F: CTGCACTCGCTGTGTCCTT R: ACCAACAAAATAGAACCCAAAAGTC anchor: GGGTCTCTGCATGTGGCTTAT-FL sensor: LCRed640-TCG GAC GGA GTTCGGCT—PH Cox F: CAACATTTGTTAAAAGCTATCCAA Cox R: ATCGGAAAACAGCGTACAATCATA Cox nR: TTATAGTACAGGATTAGATAACCC F: CTTTGCCTAGGATACTTCTT R: ACGGCAAGTGGTGAGAACT Ts-I: AAGGATCCGTCTCTGTACCCGCCGC Ts-R: TGTGAGACTCAAATGCCCTA	Sibeko et al., 2008
<i>T. parva</i>	CoxIII, ПЦР-ПДРФ	776	Th.ori-F: TCCTTGTTCCTCGCTCTGCT Th.ori-R: AGGCAGGCTTTTTTGC <u>CGCTGA</u> (подчеркнутые базы имеют полиморфизм)	Ota et al., 2009
<i>T. orientalis</i>	MPSP, традиционный	273	p33F: GTAAGACTYGACTACTTCT p33R: AGCGGATGAGRAMAGCGCTGAG	Kubota et al., 1996; Kamau et al. 2011
<i>T. orientalis</i>	Икеда-specific, традиционный	826	F3: GTAAGACTYGACTACTTCT B3: AGGCGATGAGRAMAGCGCTGAG FIP:	Pulford et al., 2016
<i>T. orientalis</i>	HRM ПЦР в реальном времени	200	GCCTCGCTCTCAAGCTTTTGTAGAGATTCAAGGAGGTTTACTTC BIP: TGAACAATGCTTGGCCTTTGTTTACGGCAAGTGGTGAGAACTT	Wang et al., 2010
<i>T. sergenti</i>	MPSP p33, традиционный	Множе- ственные полосы	F: CAGTACCTCGATGAAAGTTGTA R: CGAGTCTTACGACTTTCTTCT	Wang et al., 2010
<i>T. sergenti</i>	MPSP p33, LAMP	240	Probe: (6-Fam)CTCGACGCATCCAAAGTTCGCA G(Tamra) (Phosphate)	Choi et al., 1997; Jeong et al., 2003

Специфичность молекулярных исследований

Большинство молекулярных анализов зависит от праймеров и/или зондов, нацеленных на небольшие, консервативные области генов, характерных для всех членов вида или рода. В случае с генами, кодирующими белки, вырожденный характер генетического кода затрудняет разработку конкретных праймеров или зондов, снижая их чувствительность по сравнению с более консервативными рибосомальными генами (Pienaar et al., 2011a, 2013). Однако гены белков могут обеспечить большую специфичность за счет отдаленности ортологичных отношений (Odongo et al., 2010; Pienaar et al., 2011a). В условиях ограниченной информации о разнообразии гена или ограничения доступности общей информации о геноме, задача разработки конкретных методов анализа заключается в идентификации уникальных регионов в генах или геноме. Примером этому могут служить праймеры RLB для одновременного обнаружения *Theileria* и *Babesia*. Они нацелены на районы 18S рРНК, с заключенной между ними областью гиперпеременной V4 и остаются на сегодняшний день характеристичными для всех членов этих родов (Gubbels et al., 1999). Особо следует отметить, что этот метод был разработан для оценки разнообразия 18S рРНК у домашних животных и в дикой природе задолго до того, как стала доступна обширная геномная информация для рода *Theileria* (Gubbels et al., 1999). Зонды, используемые в методе RLB, являются видоспецифичными, основанными на последовательностях генов рибосомной РНК (Allsopp et al., 1993; Bishop et al., 1995). Они могут обнаруживать всех членов вида, согласно постулированию сохранности области гиперпеременной 18S в пределах видов. Чувствительность ДНК-зондов значительно увеличивается благодаря ПЦР амплификации минимальных количеств ДНК возбудителя заболевания, присутствующих в крови животных (Allsopp et al., 1989). Видоспецифичные ДНК-зонды были разработаны для *T. parva* (Allsopp and Allsopp, 1988; Conrad et al., 1987; Morzaria et al., 1999), *T. mutans* (Morzaria, 1989) и *T. annulata* (d'Oliveira et al., 1995).

Чувствительность молекулярных методов исследований и диапазоны паразитемии

Большинство молекулярных анализов нацелено на обнаружение геномной ДНК и, следовательно, их чувствительность зависит от эффективности ее извлечения, т. е. выхода, количества копий генов в геноме, количестве паразитов (геномных копий) на выборку клеток и уровня паразитемии (т.е. процента инфицированных эритроцитов). Образцами, наиболее подходящими для молекулярной детекции *Theileria* spp. у позвоночных хозяев, являются кровь и селезенка. После отбора они должны быть охлаждены до + 4 ° С. Однако, если образцы не используются в течение ближайших 72 часов, их следует хранить при -20 ° С. Образцы крови в полевых условиях можно сушить на бумажных носителях (картах ФТА), что упрощает транспортировку и долгое хранение (Rahikainen et al., 2016).

Большинство молекулярных анализов, основанных на традиционной технологии ПЦР или ПЦР в режиме реального времени, соответствует необходимому уровню требований в отношении аналитической чувствительности (>400000 паразитов/литр крови животного). Согласно естественному распределению паразитемии у животных-носителей, эти анализы позволяют обнаруживать большинство инфицированных особей в эндемических условиях. Однако потенциал ложноотрицательных результатов возможно оценить только в пределах биологической модели, когда паразит находится

внутри его позвоночного хозяина, т.е. паразитемии в переносчике, которое будет поддерживать заражение вектора и последующую передачу (Mans et al., 2015).

Конкретный диапазон паразитемии вида может определять его практический предел детектирования. Поскольку большинство видов *Theileria* spp. обычно имеют более высокие диапазоны паразитемии в состоянии носительства (Mans et al., 2015), можно сделать вывод, что анализы ПЦР в реальном времени должны позволять выявлять большинство инфицированных животных в стаде. Однако, в случаях колебания паразитемии ниже пределов обнаружения, необходимо применение нескольких раундов тестирования (Ueti et al., 2012).

Коинфекции

Наиболее сложными для диагностики представляются случаи, когда чувствительность анализа зависит от наличия смешанных инфекций. Действительно, клещи-переносчики могут быть коинфицированы множеством разнообразных патогенов и непатогенных симбионтов, которые могут мешать поддержанию и передаче патогенов или могут способствовать их сохранению (Moutailler et al., 2016; Lempereur et al., 2017). Количество сопутствующих инфекций КРС может варьировать от двух до шести или более различных патогенов, передаваемых клещами (Hailemariam et al., 2017; Ringo et al., 2018), хотя большинство смешанных инфекций встречаются как двойные инфекции (Hailemariam et al., 2017). Котрансмиссия нескольких патогенов может привести к коинфекции, которая увеличивает тяжесть и продолжительность заболевания, риски передачи (Vaumourin et al., 2015) или давать развитие атипичных симптомов, что создает диагностические трудности (Moutailler et al., 2016).

В случае коинфекции чувствительность молекулярных методов, например метода RLB, в значительной степени зависит от использования универсальных праймеров, поскольку они в ходе ПЦР истощаются преобладающими видами, присутствующими в образце, одновременно давая слабый сигнал от менее распространенной матрицы (Pienaar et al., 2011a). Решением этой проблемы может быть разработка более специфичных праймеров и соответствующих условий проведения ПЦР, уменьшающих описанное выше явление, за счет небольшого снижения аналитической чувствительности, но с повышением общей эффективности для полевых образцов (Pienaar et al., 2011b).

Для решения аналогичной проблемы, подавления чувствительности при использовании универсальных праймеров для анализа *cox III*, была предложена стратегия вложенного ПЦР (Chaisi et al., 2013), повышающего общую чувствительность (Schnittger et al., 2004; Odongo et al., 2010; Ueti et al., 2012). Однако метод требует осторожности в связи с проблемами лабораторного загрязнения или не достаточной специфичности праймеров, что приводит к подавлению ПЦР наиболее доминирующими генотипами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, несмотря на наличие обширных ресурсов для диагностики *Theileria* spp., для их уверенной диагностики необходимо сочетание методов идентификации возбудителя заболевания, применяемых на одном и том же образце, поскольку многие из доступных анализов ограничены по специфичности и чувствительности. Поэтому положительный диагноз в ряде случаев возможен только как результат по крайней мере двух независимых методов или нескольких анализов. Лучшее понимание биологических характеристик многих «новых» видов паразита, а также накопление информации о новых сиквенсах в базах данных позволит в будущем улучшить диагностические возможности, что положительно скажется на эпидемиологии болезни.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования выполнены в рамках Государственного задания Минобрнауки России № 0445-2021-0016.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зубайрова М.М., Газимагомедов М.Г., Атаев А.М., Абдулмагомедов С.Ш. 2017. Эпизоотология смешанных инвазий пироплазмидов крупного рогатого скота в Терско-Сулакской низменности. Ветеринария и кормление 5: 28–30. [Zubairova M.M., Gazimagomedov M.G., Ataev A.M., Abdulmagomedov S.Sh. 2017. The epizootology of mixed invasions of piroplasmosis of cattle in Terek-Sulak lowland. Veterinaria i kormlenie 5: 28–30. (in Russian)]
- Новак М.Д., Енгашев С.В., Филимонов Д.Н. 2019. Анаплазмоз и бабезиоз крупного рогатого скота в Центральном районе Российской Федерации. Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 20: 421–427. [Novak M.D., Engashev S.V., Filimonov D.N. Anaplasmosis and babesiosis of cattle in Central region of Russian federation. Theory and Practice of Struggle Against Parasitic Diseases 20: 421–427. (in Russian)] DOI: 10.31016/978-5-9902340-8-6.2019.20.421-427
- Самойловская Н.А., Успенский А.В., Новосад Е.В., Гулюкин Е.А., Малышева Н.С., Буренок А.С., Орлова И.И., Белоусова И.Н. 2015. Гемоспоридиозы сельскохозяйственных, домашних и диких животных на территории российской федерации. Российский паразитологический журнал. 3: 37–44. [Samoylovskaya N.A., Uspensky A.V., Novosad E.V., Gulyukin E.A., Malysheva N.S., Buryonok A.S., Orlova I.I., Belousova I.N. Hemosporidiosis of farm, domestic and wild animals on the territory of Russian federation. Russian Journal of Parasitology 3: 37–44. (in Russian)] DOI:10.12737/13267
- Alhassan A., Govind Y., Tam N.T., Thekiso O.M.M., Yokoyama N., Inoue N., Igarashi I. 2007. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. Parasitology Research 100 (5): 1165–1168. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0430-6>
- Allsopp B.A., Allsopp M.T.E.P. 1988. *Theileria parva*: genomic DNA studies reveal intra-specific sequence diversity. Molecular and Biochemical Parasitology 28 (1): 77–83. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(88\)90183-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(88)90183-1)
- Allsopp B.A., Baylis H.A., Allsoppi M.T.E.P., Cavalier-Smith T., Bishop R.P., Carrington D.M., Sohanpal B., Spooner, P. 1993. Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal RNA sequences. Parasitology 107 (2): 157–165. <https://doi.org/10.1017/S0031182000067263>
- Allsopp B., Carrington M., Baylis H., Sohal S., Dolan T., Iams K. 1989. Improved characterization of *Theileria parva* isolates using the polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. Molecular and Biochemical Parasitology 35 (2):137–147. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90116-3](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90116-3)
- Altay K., Aydin F.M., Dumanli N., Aktas M. 2008. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. Veterinary Parasitology 158 (4): 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.025>
- Bishop R., Allsopp B., Spooner P., Sohanpal B., Morzaria S., Gobright E. 1995. *Theileria*: improved species discrimination using oligonucleotides derived from large subunit ribosomal RNA sequences. Experimental Parasitology 80 (1): 107–115. <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1012>
- Bishop R., Sohanpal B., Kariuki D.P., Young A.S., Nene V., Baylis H., Allsopp B.A., Spooner P.R., Dolan T.T., Morzaria S.P. 1992. Detection of a carrier state in *Theileria parva*-infected cattle by the polymerase chain reaction. Parasitology 104 (2): 215–232. <https://doi.org/10.1017/S0031182000061655>
- Bott N.J., Campbell B.E., Beveridge I., Chilton N.B., Rees D., Hunt P.W., Gasser R.B. 2009. A combined microscopic-molecular method for the diagnosis of strongylid infections in sheep. International Journal for Parasitology 39 (11): 1277–1287. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.03.002>
- Burridge M.J., Brown C.G.D., Kimber C.D. 1974. *Theileria annulata*: Cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. Experimental Parasitology 35 (3): 374–380. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(74\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0014-4894(74)90043-5)
- Bursakov S.A., Kovalchuk S.N. 2019. Co-infection with tick-borne disease agents in cattle in Russia. Ticks and Tick-borne Diseases 10 (3): 709–713. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.004>
- Chae J.-s., Lee J.-m., Kwon O.-d., Holman P.J., Waghela S.D., Wagner G.G. 1998. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene variable (V4) region among and within geographic isolates of *Theileria* from cattle, elk and white-tailed deer. Veterinary Parasitology 75 (1): 41–52. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00183-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00183-0)
- Chaisi M.E., Janssens M.E., Vermeiren L., Oosthuizen M.C., Collins N.E., Geysen D. 2013. Evaluation of a real-time PCR test for the detection and discrimination of *Theileria* species in the African buffalo (*Syncerus caffer*). PLoS ONE 8 (10): e75827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075827>

- Choi E.J., Kang S.W., Kweon C.H., Jeong W.S., Yoon Y.D., Song H.J. 1997. Rapid detection of *Theileria sergenti* by polymerase chain reaction. *Korean Journal of Parasitology* 35 (2): 111–117. <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.1997.35.2.111>
- Collins N.E., Allsopp M.T.E.P., Allsopp B.A. 2002. Molecular diagnosis of theileriosis and heartwater in bovines in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96 (S1): S217–S224. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90079-9](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90079-9)
- Conrad P.A., Stagg D.A., Grootenhuys J.G., Irvin A.D., Newson J., Njamungeh R.E., Rossiter P.B., Young A.S. 1987. Isolation of *Theileria* parasites from African buffalo (*Syncerus caffer*) and characterization with anti-schizont monoclonal antibodies. *Parasitology* 94 (3): 413–423. <https://doi.org/10.1017/S0031182000055761>
- Criado-Fornelio A. 2007. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasmids. *Parassitologia* 49 (S1): 39–44. https://www.researchgate.net/profile/Monica_Florin-Christensen/publication/6147199_Taking_advantage_of_the_polymorphism_of_the_MSA-2_family_for_Babesia_bovis_strain_characterization/links/548df9710cf225bf66a5f7ae/Taking-advantage-of-the-polymorphism-of-the-MSA-2-family-for-Babesia-bovis-strain-characterization.pdf#page=39
- de Waal D.T. 1992. Equine piroplasmiasis: A review. *British Veterinary Journal* 148 (1): 6–14. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(92\)90061-5](https://doi.org/10.1016/0007-1935(92)90061-5)
- d'Oliveira C., van der Weide M., Habela M.A., Jacquet P., Jongejan F. 1995. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (10): 2665–2669. <https://jcm.asm.org/content/jcm/33/10/2665.full.pdf>
- El-Ashker M., Hotzel H., Gwida M., El-Beskawy M., Silaghi C., Tomaso H. 2015. Molecular biological identification of *Babesia*, *Theileria*, and *Anaplasma* species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray. *Veterinary Parasitology* 207 (3–4): 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.025>
- Florin-Christensen M., Schnittger L. 2009. Piroplasmids and ticks: a long-lasting intimate relationship. *Frontiers in Bioscience* 14: 3064–3073. DOI: 10.2741/3435
- Gardner M.J., Bishop R., Shah T., de Villiers E.P., Carlton J.M., Hall N., Ren Q., Paulsen I.T., Pain A., Berriman M., Wilson R.J.M., Sato S., Ralph S.A., Mann D.J., Xiong Z., Shallom S.J., Weidman J., Jiang L., Lynn J., Weaver B., Shoaibi A., Domingo A.R., Wasawo D., Crabtree J., Wortman J.R., Haas B., Angiuoli S.V., Creasy T.H., Lu C., Suh B., Silva J.C., Utterback T.R., Feldblyum T.V., Perlea M., Allen J., Nierman W.C., Taracha E.L.N., Salzberg S.L., White O.W., Fitzhugh H.A., Morzaria S., Venter J.C., Fraser C.M., Nene V. 2005. Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science* 309 (5731): 134–137. <https://doi.org/10.1126/science.1110439>
- Gebrekidan H., Perera P.K., Ghafar A., Abbas T., Gasser R.B., Jabbar A. 2020. An appraisal of oriental theileriosis and the *Theileria orientalis* complex, with an emphasis on diagnosis and genetic characterisation. *Parasitology Research* 119 (1): 11–22. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06557-7>
- Geysen D., Bishop R., Skilton R., Dolan T.T., Morzaria S. 1999. Molecular epidemiology of *Theileria parva* in the field. *Tropical Medicine and International Health* 4 (9): A21–A27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00447.x>
- Gotia H.T., Munro J.B., Knowles D.P., Daubenberger C.A., Bishop R.P., Silva J.C. 2016. Absolute quantification of the host-to-parasite DNA ratio in *Theileria parva*-infected lymphocyte cell lines. *PLoS ONE* 11 (3): e0150401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150401>
- Gubbels J.M., de Vos A.P., van der Weide M., Viseras J., Schouls L.M., de Vries E., Jongejan F. 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (6): 1782–1789. DOI: 10.1128/JCM.37.6.1782-1789.1999
- Gubbels M.J., Hong Y., van der Weide M., Qi B., Nijman I.J., Guangyuan L., Jongejan F. 2000. Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *International Journal for Parasitology* 30 (8): 943–952. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00074-6)
- Hailemariam Z., Krücken J., Baumann M., Ahmed J.S., Clausen P.-H., Nijhof A.M. 2017. Molecular detection of tick-borne pathogens in cattle from Southwestern Ethiopia. *PLoS ONE* 12(11): e0188248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188248>
- Hayashida K., Hara Y., Abe T., Yamasaki C., Toyoda A., Kosuge T., Suzuki Y., Sato Y., Kawashima S., Katayama T., Wakaguri H., Inoue N., Homma K., Tada-Umezaki M., Yagi Y., Fujii Y., Habara T., Kanehisa M., Watanabe H., Ito K., Gojobori T., Sugawara H., Imanishi T., Weir W., Gardner M., Pain A., Shiels B., Hattori M., Nene V., Sugimoto C. 2012. Comparative genome analysis of three eukaryotic parasites with differing abilities to transform leukocytes reveals key mediators of *Theileria*-induced leukocyte transformation. *mBio* 3 (5): e00204-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00204-12>
- Heidarpour Bami M., Haddadzadeh H.R., Kazemi B., Khazraiiinia P., Bandehpour M., Aktas M. 2009. Molecular identification of ovine *Theileria* species by a new PCR-RFLP method. *Veterinary Parasitology* 161 (3–4): 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.035>

- Herwaldt B.L., Cacciò S., Gherlinzoni F., Aspöck H., Slemenda S.B., Piccaluga P., Martinelli G., Edelhofer R., Hollenstein U., Poletti G., Pampiglione S., Löschenberger K., Tura S., Pieniżak N.J. 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 9 (8): 942–948. <https://doi.org/10.3201/eid0908.020748>
- Jeong W., Kweon C.H., Kang S.W., Paik S.G. 2003. Diagnosis and quantification of *Theileria sergenti* using Taq-Man PCR. *Veterinary Parasitology* 111 (4): 287–295. [https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-22](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)0Kamau J., de Vos A.J., Playford M., Salim B., Kinyanjui P., Sugimoto C. 2011. Emergence of new types of <i>Theileria orientalis</i> in Australian cattle and possible cause of theileriosis outbreaks. <i>Parasites and Vectors</i> 4: 22. <a href=)
- Kappmeyer L.S., Thiagarajan M., Herndon D.R., Ramsay J.D., Caler E., Djikeng A., Gillespie, J.J., Lau, A.O.T, Roalson, E.H., Silva J.C., Silva M.G., Suarez C.E., Ueti V.W., Nene V.M., Mealey R.H., Knowles D.P., Brayton K.A. 2012. Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. *BMC Genomics* 13: 603. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-603>
- Katzer F., McKellar S., Ben Miled L., D’Oliveira C., Shiels B. 1998. Selection for antigenic diversity of Tams1, the major merozoite antigen of *Theileria annulata*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 849 (1): 96–108. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb11039.x>
- Katzer F., Ngugi D., Oura C., Bishop R.P., Taracha E.L.N., Walker A.R., McKeever D.J. 2006. Extensive genotypic diversity in a recombining population of the apicomplexan parasite *Theileria parva*. *Infection and Immunity* 74 (10): 5456–5464. <https://doi.org/10.1128/IAI.00472-06>
- Kim C.M., Blanco L.B.C., Alhassan A., Iseki H., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi I. 2008. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Veterinary Parasitology* 151 (2-4): 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.023>
- Kirvar E., Ilhan T., Katzer F., Hooshmand-Rad P., Zweggarth E., Gerstenberg C., Phipps P., Brown C.G.D. 2000. Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. *Parasitology* 120 (3): 245–254. <https://doi.org/10.1017/S0031182099005466>
- Kubota S., Sugimoto C., Kakuda T., Onuma M. 1996. Analysis of immunodominant piroplasm surface antigen alleles in mixed populations of *Theileria sergenti* and *T. buffeli*. *International Journal of Parasitology* 26 (7): 741–747. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(96\)00047-1](https://doi.org/10.1016/0020-7519(96)00047-1)
- Kundave V.R., Patel A.K., Patel P.V., Hasnani J.J., Joshi C.G. 2015. Detection of theileriosis in cattle and buffaloes by polymerase chain reaction. *Journal of Parasitic Diseases* 39 (3): 508–513. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0386-2>
- Kundave V.R., Ram H., Banerjee P.S., Garg R., Mahendran K., Ravikuma G.V.P.P.S., Tiwari A.K. 2018. Development of multiplex PCR assay for concurrent detection of tick borne haemoparasitic infections in bovines. *Acta Parasitologica* 63 (4): 759–765. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0090>
- Lempereur L., Beck R., Fonseca I., Marques C., Duarte A., Santos M., Zúquete S., Gomes J., Walder G., Domingos A., Antunes S., Baneth G., Silaghi C., Holman P., Zint A. 2017. Guidelines for the detection of *Babesia* and *Theileria* parasites. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 17 (1): 51–65. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1955>
- Li Z., Liu J., Ma Q., Xu J., Wang J., Liu A., Li Y., Guan G., Luo J., Yin H. 2020. Development and evaluation of a chemiluminescence immunoassay for detecting tropical theileriosis. *Acta Tropica* 202: 105245. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105245>
- Mans B.J., Pienaar R., Latif A.A. 2015. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 4 (1): 104–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.12.006>
- Martin-Sanchez J., Viseras J., Adroher F.J., García-Fernández P. 1999. Nested polymerase chain reaction for detection of *Theileria annulata* and comparison with conventional diagnostic techniques: its use in epidemiology studies. *Parasitology Research* 85 (3): 243–245. <https://doi.org/10.1007/s004360050541>
- Morrison D.A. 2009. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends in Parasitology* 25 (8): 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.010>
- Morzaria S.P. 1989. Identification of *Theileria* species and characterization of *Theileria parva* stocks. In: Dolan T.T. (eds) *Theileriosis in Eastern, Central and Southern Africa: Proceeding Workshop on East Coast Fever Immunization, Lilongwe, Malawi, 20–22 September, 1988*. Nairobi, Kenya. ILRAD. 102–110.
- Morzaria S.P., Katende J., Musoke A., Nene V., Skilton R., Bishop R. 1999. Development of sero-diagnostic and molecular tools for the control of important tick-borne pathogens of cattle in Africa. *Parasitologia* 41 (S1): 73–80.
- Moutailler S., Moro C.V., Vaumourin E., Michelet L., Tran F.H., Devillers E., Cosson J.-F., Gasqui P., Van V.T., Mavingui P., Voure’h G., Vayssier-Taussat M. 2016. Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 10 (3): e0004539. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539>

- Nene V., Morrison W.I. 2016. Approaches to vaccination against *Theileria parva* and *Theileria annulata*. *Parasite Immunology* 38 (12): 724–734. <https://doi.org/10.1111/pim.12388>
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28 (12): e63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Odongo D.O., Sunter J.D., Kiara H.K., Skilton R.A., Bishop R.P. 2010. A nested PCR assay exhibits enhanced sensitivity for detection of *Theileria parva* infections in bovine blood samples from carrier animals. *Parasitology Research* 106 (2): 357–365. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1670-z>
- Oosthuizen M.C., Zwegarth E., Collins N.E., Troskie M., Penzhorn B.L. 2008. Identification of a novel *Babesia* sp. from a sable antelope (*Hippotragus niger* Harris, 1838). *Journal of Clinical Microbiology* 46 (7): 2247–2251. DOI: 10.1128/JCM.00167-08
- Ota N., Mizuno D., Kuboki N., Igarashi I., Nakamura Y., Yamashina H., Hanzaike T., Fujii K., Onoe S., Hata H., Kondo S., Matsui S., Koga M., Matsumoto K., Inokuma H., Yokoyama N. 2009. Epidemiological survey of *Theileria orientalis* infection in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 71(7): 937–944. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.937>
- Pain A., Renauld H., Berriman M., Murphy L., Yeats C.A., Weir W., Kerhornou A., Aslett M., Bishop R., Bouchier C., Cochet M., Coulson R.M.R., Cronin A., de Villiers E.P., Fraser A., Fosker N., Gardner M., Goble A., Griffiths-Jones S., Harris D.E., Katzer F., Larke N., Lord A., Maser P., McKellar S., Mooney P., Morton F., Nene V., O'Neil S., Price C., Quail M.A., Rabinowitz E.I., Rawlings N.D., Rutter S., Saunders D., Seeger K., Shah T., Squares R., Squares S., Tivey A., Walker A.R., Woodward J., Dobbelaere D.A.E., Langsley G., Rajandream M.A., McKeever D., Shiels B., Tait A., Barrell B., Hall N. 2005. Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*. *Science*. 309 (5731): 131–133. <https://doi.org/10.1126/science.1110418>
- Papli N.E., Landt O., Fleischer C., Koekemoer J.O., Mans B.J., Pienaar R., Josemans A., Zwegarth E., Potgieter F., Latif A.A. 2011. Evaluation of a TaqMan real-time PCR for the detection of *Theileria parva* in buffalo and cattle. *Veterinary Parasitology* 175 (3-4): 356–359. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.038>
- Perera P.K., Gasser R.B., Firestone S.M., Smith L., Roeber F., Jabbar A. 2015. Semiquantitative multiplexed tandem PCR for the detection and differentiation of four *Theileria orientalis* genotypes in cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 53 (1): 79–87. DOI: 10.1128/JCM.02536-14
- Pienaar R., Latif A.A., Thekisoe O.M.M., Mans B.J. 2013. Protein gene candidates for the qualitative molecular detection of *Theileria parva* in African buffalo (*Syncerus caffer*) using the real-time SYBR green polymerase chain reaction. *Proceedings of the 1st Annual International Conference on Advances in Veterinary Science Research (VETSCI2013)*, Singapore.
- Pienaar R., Potgieter F.T., Latif A.A., Thekisoe O.M.M., Mans B.J. 2011a. Mixed *Theileria* infections in free-ranging buffalo herds: implications for diagnosing *Theileria parva* infections in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) *Parasitology* 138 (7): 884–895. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000503>
- Pienaar R., Potgieter F.T., Latif A.A., Thekisoe O.M.M., Mans B.J. 2011b. The Hybrid II assay: a sensitive and specific real-time hybridization assay for the diagnosis of *Theileria parva* infection in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle. *Parasitology* 138 (14): 1935–1944. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001454>
- Pienaar R., Potgieter F.T., Latif A.A., Thekisoe O.M.M., Mans B.J. 2014. Geographic distribution of *Theileria* sp. (buffalo) and *Theileria* sp. (bougasvlei) in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) in southern Africa: implications for speciation. *Parasitology* 141 (3): 411–424. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001728>
- Pulford D.J., Gias E, Bueno I.M., McFadden A.M.J. 2016. Developing high throughput quantitative PCR assays for diagnosing Ikeda and other *Theileria orientalis* types common to New Zealand in bovine blood samples. *New Zealand Veterinary Journal* 64 (1): 29–37. <https://doi.org/10.1080/00480169.2015.1089798>
- Rahikainen A.-L., Palo J.U., Leeuw W., Budowle B., Sajantila A. 2016. DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards. *Forensic Science International* 261: 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.02.014>
- Ringo A.E., Moumouni P.F.A., Lee S.-H., Liu M., Khamis Y.H., Gao Y., Guo H., Zheng W., Efstratiou A., Galon E.M., Li J., Tiwananthagorn S., Inoue N., Suzuki H., Thekisoe O., Xuan X. 2018. Molecular detection and characterization of tick-borne protozoan and rickettsial pathogens isolated from cattle on Pemba Island, Tanzania. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 9 (6): 1437–1445. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.014>
- Salih D.A., Ali A.M., Liu Z., Bakheit M.A., Taha K.M., El Imam A.H., Kullmann B., El Hussein A.M., Ahmed J.S. Seitzer U. 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Theileria lestoquardi*. *Parasitology Research* 110 (2): 533–538. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2518-x>
- Salim B., Bakheit M.A., Sugimoto C. 2013. Rapid detection and identification of *Theileria equi* and *Babesia caballi* by high-resolution melting (HRM) analysis. *Parasitology Research* 112 (11): 3883–3886. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3581-2>

- Santos M., Soares R., Costa P., Amaro A., Inácio J., Gomes J. 2013. Revisiting the Tams1-encoding gene as a species-specific target for the molecular detection of *Theileria annulata* in bovine blood samples. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 4 (1-2): 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.07.006>
- Schnittger L., Yin H., Qi B., Gubbels M.J., Beyer D., Niemann S. 2004. Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. *Parasitology Research* 92 (3): 189–196. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0980-9>
- Shirozu T., Badolo A., Soga A., Yoshimura A., Morishita Y.K., Koketsu M., Shirafuji R.U., Inokuma H., Yokoyama N., Fukumoto S. 2020. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting *Theileria* parasites infecting Yezo sika deer. *Parasitology International* 77: 102130. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102130>
- Sibeko K.P., Oosthuizen M.C., Collins N.E., Geysen D., Rambritch N.E., Latif A.A., Groeneveld H.T., Potgieter F.T., Coetzer J.A. 2008. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction test for the detection of *Theileria parva* infections in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle. *Veterinary Parasitology* 155 (1-2): 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetpa.2009.07.004>
- Sivajothi S., Reddy B.S. 2018. Molecular Diagnosis of Parasitic Diseases in Sheep – A Review. *International Journal of Livestock Research* 8 (2): 14–24. <https://doi.org/10.5455/ijlr.20170922043628>
- Skilton R.A., Bishop R.P., Katende J.M., Mwaura S., Morzaria S.P. 2002. The persistence of *Theileria parva* infection in cattle immunized using two stocks, which differ in their ability to induce a carrier state: analysis using a novel blood spot PCR assay. *Parasitology* 124 (3): 265–276. <https://doi.org/10.1017/S0031182001001196>
- Thekisoe O.M., Rambritch N.E., Nakao R., Bazie R.S., Mbatia P., Namangala B., Malele I., Skilton R.A., Jongejan F., Sugimoto C., Kawazu S., Inoue N. 2010. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of *Theileria parva* infections targeting the PIM and p150 genes. *International Journal of Parasitology* 40 (1): 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.07.004>
- Tokarevich N., Tronin A., Gnativ B., Revich B., Blinova O., Evengard B. 2017. Impact of air temperature variation on the ixodid ticks habitat and tick-borne encephalitis incidence in the Russian Arctic: The case of the Komi Republic. *International Journal Circumpolar Health*. 76 (1): 1298882. <https://doi.org/10.1080/2423982.2017.1298882>
- Ueti M.W., Mealey R.H., Kappmeyer L.S., White S.N., Kumpula-McWhirter N., Pelzel A.M., Graue J.F., Bunn T.O., Schwartz A., Traub-Dargatz J.L., Hendrickson A., Espy B., Guthrie A.J., Fowler W.K., Knowles D.P. 2012. Re-emergence of the apicomplexan *Theileria equi* in the United States: elimination of persistent infection and transmission risk. *PLoS ONE* 7 (9): e44713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044713>
- Vaumourin E., Voure'h G., Gasqui P., and Vayssier-Taussat M. 2015. The importance of multiparasitism: examining the consequences of co-infections for human and animal health. *Parasites and Vectors* 8 (1): 545. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1167-9>
- Wang J., Yang J., Gao S., Liu A., Rashid M., Li Y., Liu Z., Liu J., Liu G., Luo J., Guan G., Yin H. 2020. Rapid detection and differentiation of *Theileria annulata*, *T. orientalis* and *T. sinensis* using high-resolution melting analysis. *Ticks and Tick-Borne Disease*. 11 (1): 101312. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101312>
- Wang J., Yang J., Liu J., Wang X., Xu J., Liu A., Li Y., Liu Z., Ren Q., Luo J., Guan G., Yin H. 2018. Molecular detection and genetic diversity of *Theileria orientalis* in cattle in China. *Parasitology Research* 117 (12): 3689–3694. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6023-3>
- Wang L.X., He L., Fang R., Song Q.Q., Tu P., Jenkins A., Zhou Y.Q., Zhao J.L. 2010. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Theileria sergenti* infection targeting the p33 gene. *Veterinary Parasitology* 171 (1-2): 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.046>
- Yang Y., Mao Y., Kelly P., Yang Z., Luan L., Zhang J., Li J., El-Mahallawy H.S., Wang C. 2014. A pan-*Theileria* FRET-qPCR survey for *Theileria* spp. in ruminants from nine provinces of China. *Parasites and Vectors* 7: 413. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-413>
- Zaemi M., Haddadzadeh H., Khazraiiina P., Kazemi B., Bandehpour M. 2011. Identification of different *Theileria* species (*Theileria lestoquardi*, *Theileria ovis*, and *Theileria annulata*) in naturally infected sheep using nested PCR-RFLP. *Parasitology Research* 108 (4): 837–843. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2119-0>
- Zhao H., Liu J., Li Y., Yang C., Zhao S., Liu J., Liu A., Liu G., Yin H., Guan G., Luo J. 2016. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine PBMCs transformed and non-transformed by *Theileria annulata*. *Korean Journal of Parasitology* 54 (1): 39–46. doi: 10.3347/kjp.2016.54.1.39
- Zhou M., Cao S., Sevinc F., Sevinc M., Ceylan O., Moumouni P.F., Jira-pattharasate C., Liu M., Wang G., Iguchi A., Vudriko P., Suzuki H., Xuan X. 2016. Molecular detection and genetic identification of *Babesia bigemina*, *Theileria annulata*, *Theileria orientalis* and *Anaplasma marginale* in Turkey. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7 (1): 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.09.008>

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF CATTLE THEILERIOSIS

S. A. Bursakov

Keywords: *Theileria*, theileriosis, cattle, molecular diagnostics

SUMMARY

Detection and treatment of theileriosis is an important tool for controlling this disease. Wide range of *Theileria* spp. species, their species-specific characteristics, disease severity, and drug susceptibility determine the importance of accurate identification of the pathogen for epidemiological research and diagnostic purposes, taking into account the characteristics of their vertebrate hosts and arthropod vectors. The presence of many varieties of *Theileria* is an incentive for the creation of PCR test systems with an ability to identify different species, as well as to register coinfection. Modern methods of control detection and spreading of the disease do not always allow recognizing early stages; this fact, taking in account high transience of the disease, can contribute to losses in animal husbandry. Hence, the development of rapid and sensitive detection methods in the early stages of the disease causes interest. The present paper presents modern approaches to the molecular diagnostics of *Theileria* spp.

УДК 595.771

**РАЗЛИЧИЕ В РАСПРЕДЕЛЕНИИ ЗИМУЮЩИХ САМОК
КРОВСОСУЩИХ КОМАРОВ ИЗ РОДОВ *CULEX* И *CULISETA*
(DIPTERA, CULICIDAE) В ПРИВХОДОВЫХ ЧАСТЯХ ПЕЩЕР:
СВЯЗЬ С РАЗНЫМИ ТРЕБОВАНИЯМИ К ТЕМПЕРАТУРЕ
И ВЛАЖНОСТИ ВОЗДУХА**

© 2021 г. А. В. Разыграев*

Зоологический институт РАН,
Университетская наб., 1, Санкт-Петербург, 199034 Россия
Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,
ул. Профессора Попова, 14, лит. А, Санкт-Петербург, 197376 Россия
*e-mail: a.v.razygraev@gmail.com

Поступила в редакцию 25.05.2020 г.

После доработки 20.11.2020 г.

Принята к печати 29.11.2020 г.

В зимний период в привходовых частях Саблинских пещер (Тосненский район, Ленинградская обл.) измерены температура и влажность воздуха в местах максимального скопления зимующих взрослых самок *Culex* L., 1758 и *Culiseta* Felt, 1904. Показано, что самки рода *Culiseta* (преимущественно, *Cs. annulata*) по сравнению с самками рода *Culex* (в основном *Cx. pipiens*) занимают, как правило, более прохладные участки пещер при совместной зимовке (средняя разница температур – 1.6 °C, $p = 0.0039$, парный критерий Уилкоксона; критерий Байеса в пользу альтернативной гипотезы выше 40). Влажность воздуха, как правило, также ниже в местах максимальных скоплений самок *Culiseta* по сравнению с таковыми для самок *Culex* (в среднем на 9.4 %, $p = 0.0051$; критерий Байеса в пользу альтернативной гипотезы выше 20). Подтверждается представление о том, что имаго рода *Culiseta* более адаптированы к низким температурам и/или лучше переносят сниженную влажность воздуха. Вероятно, при понижении температуры и влажности в привходовых частях пещер самки *Culiseta* более склонны оставаться в тех участках убежищ, которые были заняты ими ранее, тогда как самки *Culex* перемещаются на участки с более высокой температурой и влажностью воздуха.

Ключевые слова: кровососущие комары, зимовочные убежища, температура, влажность воздуха, *Culiseta annulata*, *Culex pipiens*, Culicidae, Саблинские пещеры

DOI: 10.31857/S003118472101004X

Разные виды кровососущих комаров различаются по своим температурным требованиям, что отражается на их географическом распространении и на активности имаго при различных температурах воздуха. В роде *Culiseta* Felt, 1904 известны виды, адаптированные к низким температурам (WRBU). Согласно Becker et al. (2010), вид

Cs. annulata (Schrank, 1776), широко распространенный в Европе, более обычен в северных широтах. Имаго сохраняют активность при низких температурах воздуха, например при +6 °C (Skierska, 1965; Wegner, 2009). Вид *Cs. alaskaensis* (Ludlow, 1906) также распространен в основном в областях с более прохладным климатом: он типичен для тундры и бореальной зоны, а на юге тяготеет к горным регионам (Becker et al., 2010). Многие виды рода *Culex* L., 1758 распространены в тропиках (Becker et al., 2010). В Европе два близких вида подрода *Culex* – *Cx. pipiens* L., 1758 (подвид *pipiens*, биотип “*pipiens*”) и *Cx. torrentium* Martini, 1925 – распространены симпатрично, но доля *Cx. torrentium* увеличивается в северных и горных регионах (Hesson et al., 2014). Вероятно, климатические (в частности, температурные) предпочтения этих двух видов различны.

В условиях северо-запада РФ *Cx. pipiens pipiens* (биотип “*pipiens*”), *Cx. torrentium*, *Cx. territans* Walker, 1856, *Cs. annulata*, *Cs. alaskaensis* и *Anopheles maculipennis* s. l. зимуют во взрослой фазе. Осенью оплодотворенные самки ищут зимовочные убежища, а самцы погибают до наступления зимы. При выполнении наших предыдущих исследований осенью 2019 г. представители всех вышеупомянутых видов (и видовых комплексов) были обнаружены в привходовых частях Саблинских пещер (Тосненский р-н, Ленинградская обл.). С использованием подсчета самцов в убежищах в осенний период было косвенно подтверждено, что при низких температурах (+8 °C и ниже) имаго *Cs. annulata* более активны, чем имаго *Cx. pipiens* (Разыграев, 2020). Было также замечено, что диапаузирующие самки рода *Culex* предпочитают скапливаться в предположительно более теплых и менее продуваемых участках убежищ и чаще встречаются на сводах пещер, чем на стенах, в противоположность самкам рода *Culiseta*. Соответственно, участки максимальной плотности самок *Culex* и *Culiseta* зачастую не совпадают друг с другом. Это значит, что гипотеза о различных температурных требованиях имаго родов *Culex* и *Culiseta* может быть проверена путем сравнения температур на участках с максимальной плотностью самок этих двух родов.

Цель настоящего исследования – проверка гипотезы о том, что в убежищах самки рода *Culiseta* зимуют при более низких температурах воздуха, чем самки рода *Culex*. Задачей было сравнить значения температуры (а также дополнительно значения влажности воздуха) на участках с максимальной плотностью зимующих самок рода *Culex* и самок рода *Culiseta* в одних и тех же убежищах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Измерения температуры и влажности воздуха в зимних убежищах, в местах максимальных скоплений самок родов *Culex* и *Culiseta*, проводились в Саблинских пещерах (окрестности пос. Ульяновка, Тосненский р-н, Ленинградская обл.) в период с 10 января по 29 февраля 2020 г. Вдоль левого берега р. Тосна обследованы пещеры Трехглазка (59°40'05.5" N, 30°47'41.4" E) и Санта-Мария (59°39'41.1" N, 30°48'02.5" E). На правом склоне каньона р. Тосна обследованы пещеры Жемчужная (координаты входа 59°40'06.4" N, 30°48'00.2" E) и Псевдо-Санта-Мария (отрезанная обвалами часть пещеры Жемчужная, координаты входа 59°40'05.2" N, 30°48'02.9" E). В пещерах Графский грот и Штаны, обследованных ранее (Разыграев, 2020), не было найдено участков с достаточно высокой плотностью самок *Culiseta* (описание таких участков см. ниже), поэтому попарные измерения в местах скопления самок *Culiseta* и *Culex* там не проводились. Всего обследовано 11 ниш/участков в привходовых частях пещер (в частях, удаленных от выхода менее чем на 50 м), в 4 из них были проведены также повторные попарные измерения в разные дни (табл. 1).

Таблица 1. Значения температуры и влажности воздуха в разных частях пещер в местах максимальных скоплений зимующих самок рода *Culiseta* ($C_{S_{max}}$) и рода *Culex* ($C_{X_{max}}$)
Table 1. Air temperature and humidity in various parts of caves in sites with maximum densities of *Culiseta* and *Culex* overwintering females ($C_{S_{max}}$ and $C_{X_{max}}$, respectively)

Зимовочное убежище	Дата	Число самок рода <i>Culiseta</i> в $C_{S_{max}}$ (на 272 см ²)	Число самок рода <i>Culex</i> в $C_{X_{max}}$ (на 272 см ²)	Температура воздуха в $C_{S_{max}}$ (°C)	Температура воздуха в $C_{X_{max}}$ (°C)	Влажность воздуха в $C_{S_{max}}$ (%)	Влажность воздуха в $C_{X_{max}}$ (%)
Пещера Псевдо-Санта-Мария левая стена правая конечная ниша	10.01.2020	6	12	1.7	3.6	80	86
	10.01.2020	≥ 3	≥ 10	2.8	3.9	80	89
	30.01.2020	3	15	3.2	5.3	72	85
	18.02.2020	3	19	4.8	5.0	78	82
Пещера Жемчужная правая привходовая ниша, правая часть	10.01.2020	3	17	2.7	3.6	77	90
	18.01.2020	≥ 3	≥ 10	2.8	3.6	83	88
	30.01.2020	3	33	3.5	4.2	81	85
	10.01.2020	≥ 3	≥ 40	2.0	6.0	82	96
левая привходовая (обвальная) ниша, правая часть	24.01.2020	3	45	2.9	5.7	78	92
	10.01.2020	3	18	2.2	4.0	70	94
	30.01.2020	3	67	0.6	4.6	77	86
	20.02.2020	3	9	3.2	4.2	80	84
правая привходовая ниша, в глубине	24.02.2020	3	12	3.2*	3.0*	80*	78*
	24.02.2020	4	9	1.8	3.8	78	89
	29.02.2020	3	24	2.2	4.9	69	94
	30.01.2020	3	21	3.5	3.8	75	80
Пещера Трехглазкая привходовая часть	30.01.2020	4	13	4.5	6.1	78	88

Согласно предварительной оценке, температура в различных привходовых частях пещер переменна при разных погодных условиях снаружи. Поэтому было решено одновременно оценивать температуру и влажность воздуха на участках максимальной плотности самок *Culiseta* и *Culex*, расположенных поблизости друг от друга (на расстоянии не более 2–3 м, которое соответствует ширине и глубине многих привходовых ниш) в одном и том же зимовочном убежище. Ниже приведено подробное описание оригинальной методики сравнения участков, занятых самками *Culiseta* и *Culex*, и подробно указаны причины ее использования.

Были замечены следующие особенности распределения самок *Culiseta* и *Culex*. Самки *Culiseta* в основном встречаются разрозненно, поодиночке. При этом на многих участках их нет вовсе, но иногда они образуют неплотные и, вероятно, неслучайные скопления, оцененные автором как 3 особи на 272 см² (272 см² – это площадка с практически невариабельными температурой и влажностью воздуха на ней, выделенная, например, квадратной рамкой 16.5×16.5 см). Также встречаются 2 особи на указанную площадь, что в меньшей степени может считаться неслучайным скоплением. Совсем редко число особей на указанную площадь может доходить до 6, что явно может считаться неслучайным скоплением *Culiseta* при их общей немногочисленности. Для гораздо более многочисленных самок *Culex*, напротив, на площадях такого размера нередки скопления по несколько десятков особей.

Оптимальным решением для сравнения участков, занятых самками *Culiseta* и *Culex*, было бы исследование распределений плотностей самок *Culiseta* и *Culex* по значениям температуры/влажности и сравнение их между собой. Однако при предварительных измерениях стало ясно, что для разных ниш и, тем более, разных пещер эти распределения будут разными для одного и того же рода или вида комаров – вероятно, ввиду относительно быстрой динамики температуры/влажности в продуваемых привходовых частях и относительно низкой мобильности диапаузирующих комаров, а также, возможно, различий ниш и пещер по другим, неизвестным факторам, отражающимся на распределении комаров. Это, в принципе, означает несопоставимость распределений *Culiseta* с распределениями *Culex* из разных ниш и пещер, но оставляет возможность попарных сравнений распределений *Culiseta* и *Culex* в одной и той же нише.

Полное изучение распределений *Culiseta* и *Culex* в каждой нише с последующим их попарным сравнением представляет собой работу повышенной трудоемкости. При этом предсказуемо, что результат, в случае *Culiseta*, будет малоинформативен: частоты встречаемости особей этого рода для большинства значений температуры/влажности будут представлены значениями 0 и 1, лишь иногда и далеко не для всех ниш – 3 и 4 и совсем редко – до 6 особей на выбранную площадь. Оценить форму распределения *Culiseta* по значениям температуры/влажности в большинстве ниш будет затруднительно или даже невозможно.

Технически приемлемой альтернативой явился быстрый метод: поиск такой ниши, в которой присутствует скопление самок *Culiseta* с плотностью ≥ 3 особи на 272 см², а также скопление самок *Culex* (при этом визуально обнаружить наиболее плотное скопление *Culex* в нише не составляет труда), и измерение в этих скоплениях температуры и влажности. Если скопление самок *Culiseta* обнаружено не в нише, а на стене просторного зала или коридора, то в качестве пары можно использовать область максимальной концентрации самок *Culex* в пределах расстояния, типичного для ширины и глубины ниши (2–3 м). Поиск максимальных скоплений проводится до измерения температуры и влажности в убежище, а не после.

Очевидно, в случае нормальных распределений плотностей самок по значениям температуры и влажности для участков с максимальной плотностью характерны средние арифметические и медианные значения температуры и влажности, а в случае умеренных отклонений от нормальности – более близкие к медианам, чем к средним арифметическим. Медианы вполне могут быть использованы для сравнения распределений *Culiseta* и *Culex* по температуре и влажности в каждой отдельной нише вместо средних арифметических. Таким образом, быстрый метод – это как минимум приблизительное сравнение распределений по их медианам без детального изучения самих распределений. Даже если не рассматривать такие параметры как средние значения, статистически значимое различие в температуре и/или влажности между

максимумами распределений *Culiseta* и *Culex* по площади поверхности ниши свидетельствует о том, что распределения по температуре и/или влажности неодинаковы.

Таким образом, в соответствии с вышеописанным принципом, в обследуемой нише находили участок максимального скопления самок рода *Culiseta* (Cs_{\max} , минимум 3 самки на площадь 272 см²; если в той же нише обнаруживался участок с более высокой плотностью, измерения проводили именно в нем), затем в той же нише в пределах 2–3 м находили участок того же размера с максимальной плотностью самок *Culex* (Cx_{\max}). На обоих участках попеременно в течение 5–10 мин регистрировали температуру и влажность при помощи метеометра МЭС-200, помещая измерительный щуп в середину участка, занятого зимующими самками кровососущих комаров, как показано на рис. 1. Полученные для каждого участка значения усредняли. Таким образом, получали каждую отдельную пару значений одного и того же показателя для Cs_{\max} и Cx_{\max} . Все измерения в Cs_{\max} и Cx_{\max} выполнялись в вечернее время с 17:30 до 22:00.



Рисунок 1. Измерение температуры и влажности воздуха на участке максимального скопления самок *Culiseta* (3 особи на 272 см²) при помощи метеометра МЭС-200. Измерительный щуп помещали в середину участка, занятого зимующими самками кровососущих комаров.

Figure 1. Measuring of air temperature and humidity in the area of maximum density of *Culiseta* females (3 individuals per 272 cm²) using meteorometer MES-200. A measuring probe was placed in the middle of the area occupied by overwintering mosquito females.

Большинство парных измерений выполнено в нишах, на стенах и сводах в одной и той же привходовой камере пещеры Жемчужная, но в разных участках в разные дни, что означает возможность псевдорепликации значений, полученных при участии одних и тех же групп самок. Тем не менее данный риск представляется небольшим, если исходить из общего числа самок *Culiseta* в привходовой части пещеры Жемчужная (более полусотни особей, см. раздел

«Результаты»), числа особей в Cs_{\max} , как правило равного 3, и небольшого числа участков измерений, где возможен обмен особями. Если принять во внимание парность измерений в Cs_{\max} и Cx_{\max} и общее количество самок *Culex*, исчисляемое тысячами на всю привходовую камеру с нишами, то риск частичного повторного участия одной и той же пары групп (*Culiseta* и *Culex*) в других участках становится еще ниже. Естественно, согласованная миграция одних и тех же пар групп без изменения их состава в другие участки измерений совсем маловероятна, что делает риск псевдорепликации разниц между Cs_{\max} и Cx_{\max} совсем несущественным.

Также в период с декабря 2019 г. по март 2020 г. измеряли температуру и влажность воздуха в глубине пещер (где комары не встречены) для сравнения с теми же показателями в привходовых частях. При этом измерения проводили в середине полости пещеры на одинаковом расстоянии от пола и свода. Результаты измерений температуры, выполненных в вечернее время с 17:30 до 22:00 за 5 дней в период зимовки комаров – 7 и 21 декабря 2019 г., 18 и 24 января и 6 марта 2020 г., – наносили на план-схему системы пещер «Жемчужная-Штаны».

Определение родовой принадлежности самок проводили по общим морфологическим признакам (Гуцевич и др., 1970; Becker et al., 2010). Самок *Cs. annulata* отделяли от самок *Cs. alaskaensis* непосредственно на месте по наличию предвершинных светлых колец на бедрах и срединных светлых колец на первых члениках лапок (оба признака отсутствуют у *Cs. alaskaensis*). Подсчет самок *Cs. annulata* и *Cs. alaskaensis*, как дополнение к опубликованным ранее результатам по оценке пропорции между видами (Разыграев, 2020), проводили путем сплошного обследования залов и коридоров, т.е. подсчитывали абсолютно всех особей в выбранном зале или коридоре. Самок *Culex* для определения видов и оценки пропорции между ними собирали равномерно по полостям пещер в начале и в конце зимы. Комаров собирали по одному через приблизительно равные расстояния на стенах и потолках так, чтобы в целом из отдельного зала с примыкающими к нему нишами было собрано 14–16 особей. При значительной высоте потолка (зал в пещере Жемчужная с выходом в провал) сбор велся только на стенах. В итоге в четырех залах было собрано 14, 16, 16 и 14 самок *Culex* в начале зимы (09.12.2019) и в тех же залах 16, 15, 16 и 17 самок *Culex* в конце зимы (29.02.2020). В лаборатории самок *Cx. territans* отделяли от *Cx. pipiens/torrentium* по апикальному расположению светлых перевязей на тергитах брюшка (у *Cx. pipiens/torrentium* светлые перевязи располагаются базально) (Гуцевич и др., 1970; Becker et al., 2010). *Culex pipiens* и *Cx. torrentium* разделяли по морфометрическим характеристикам крыла, используя индекс $r_{2/3} / r_3$, рассчитываемый по расстояниям между точками ветвления и окончаниями ветвей радиальных жилок, как описано в ряде работ (Börstler et al., 2014; Разыграев, Шулешко, 2018). Измерения проводились по правому крылу.

Статистическое сравнение значений температуры и влажности воздуха в местах максимальных скоплений зимующих самок родов *Culex* и *Culiseta* проводили 1) с использованием *p*-значений, полученных парным критерием Уилкоксона с поправкой Холма-Бонферрони (поскольку на одних и те же парах площадей сравнения проводили по двум показателям) и 2) с использованием байесовского критерия (Bayes factor) для парного *t*-теста. Расчеты первым способом проводились с помощью базовых функций программной среды R (версия 3.6.2) (R Core Team, 2019). Для расчета байесовского критерия применяли байесовский калькулятор, использующий программный пакет BayesFactor версии 0.9.8 в среде R версии 3.3.2 (Morey et al., 2018); при этом предварительно убеждались в том, что в распределениях разниц значений каждого из двух параметров (температуры и влажности) между Cs_{\max} и Cx_{\max} не выявляется отклонение от нормального закона (по критерию Шапиро-Уилка). При наличии повторных данных в разные дни в одной и той же части пещеры для статистических сравнений использовали те пары значений для Cs_{\max} и Cx_{\max} , которые в выборке из разных дней дают медианные значения разницы между Cs_{\max} и Cx_{\max} .

Коэффициенты корреляции Пирсона и Спирмена для оценки связи между температурой и влажностью воздуха в Cs_{\max} и Cx_{\max} высчитывали в программной среде R (версия 3.6.2) (R Core Team, 2019). При вычислениях были использованы абсолютно все значения, в том числе

полученные повторно для одних и тех же участков, поскольку показания в них различались в разные вечера.

Сравнения температуры и влажности воздуха в привходовых частях пещер с теми же показателями в глубине пещер выполнялись с применением критерия Манна-Уитни-Уилкоксона для независимых выборок (измерения были получены более или менее равномерно за зимний период, но зачастую в разные дни в разных частях пещер, и во всех случаях не одновременно, а последовательно в разных направлениях в разные дни). При этом замеры для трех участков в глубине пещер и для четырех привходовых частей объединялись в две выборки, $n = 9$ и 16 соответственно. В этих сравнениях применяли поправку Холма-Бонферрони, а также поправку на непрерывность.

Отсутствие значимых различий в частотах среди общего числа самок *Cx. pipiens* и *Cx. torrentium* в начале и в конце зимы проверяли байесовским критерием. Байесовский критерий для таблицы сопряженности 2×2 (*Cx. pipiens*–*Cx. torrentium*, декабрь–февраль) рассчитывался с использованием байесовского калькулятора (Dienes, 2008). При этом учитывались только те особи, чей индекс $r_{2/3} / r_3$ был меньше или равен 0.218 (сильное свидетельство в пользу *Cx. pipiens*) и больше или равен 0.254 (сильное свидетельство в пользу *Cx. torrentium*) (Разыграев, Шулешко, 2018). Проверка отсутствия значимых различий в частотах среди общего числа самок *Cx. pipiens* и *Cx. torrentium* в начале и в конце зимы служила для подтверждения того, что один и тот же вид стабильно преобладает над другим видом за всё время зимовки. Гипотеза о том, что частоты двух видов одного рода неравны, проверялась точным биномиальным тестом в среде R (нулевая гипотеза – вероятность обнаружения каждого из двух видов равна 0.5; альтернативная – вероятность больше или меньше 0.5).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенное обследование пещер и измерения температуры и влажности воздуха в разных залах, штрехах и штольнях показали, что в пещерах большой протяженности комары сем. Culicidae выбирают для зимовки не самые теплые участки, а те, в которых регистрируются промежуточные значения температуры, т. е. участки, расположенные ближе к выходам на поверхность (в системе «Жемчужная–Штаны» – менее 30–40 м от выхода, рис. 2). На рис. 2 представлены результаты измерений температуры внутри пещер за 5 дней, выполненных в период зимовки комаров при наружной температуре от +0.6 до +2.0 °С. Температура в привходовых частях пещер составляла от +3.4 до +7.4 °С и была значимо ниже, чем в глубине пещер, где значения варьировали от +6.7 до +8.9 °С ($p = 0.00029$). Значения влажности воздуха, полученные в те же дни (тоже в вечернее время), в привходовых частях варьировали от 67 до 99 %, а в глубине пещер – от 80 до 95 %. Диапазон влажности воздуха снаружи от пещер в дни измерений составлял от 76 до 94 %. В сравнении значений влажности, выполненном аналогично сравнению значений температуры, статистически значимое различие не выявлено ($p = 0.21$).

В привходовых частях в период с декабря 2019 г. по март 2020 г. найдены самки следующих видов и групп видов кровососущих комаров: *Culex pipiens/torrentium*, *Cx. territans*, *Culiseta annulata*, *Cs. alaskaensis* и *Anopheles maculipennis* s. l. Самки *A. maculipennis* s. l. в зимний период в Саблинских пещерах найдены впервые (5 экземпляров в январе и феврале в пещерах Жемчужная и Санта-Мария). Замечено, что в пещерах в указанный зимний период, по сравнению с предыдущими зимними периодами, самки рода *Culiseta* были более многочисленны. В отношении гораздо более многочисленных самок рода *Culex* в ряде мест внутри пещер замечена приуроченность их скоплений к углублениям сводов (рис. 3), наряду с более-менее равномерным (редким или плотным) распределением в нишах.

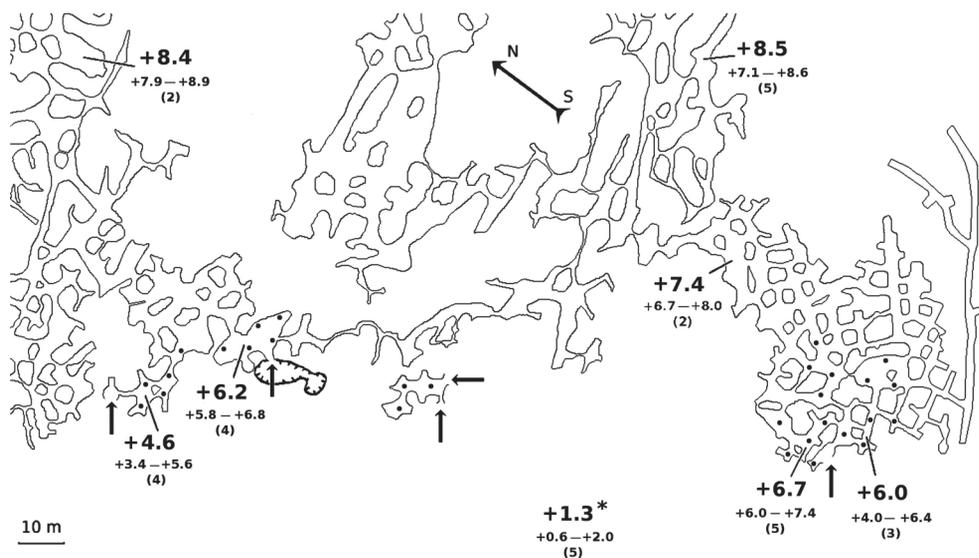


Рисунок 2. Температура воздуха в привходовых и глубинных частях системы пещер «Жемчужная–Штаны».

Температуру измеряли в течение пяти дней в период с декабря 2019 г. по март 2020 г. в вечернее время (с 17:30 до 22:00), указана в градусах Цельсия. Крупным шрифтом указана медиана, мелким шрифтом (ниже) – размах min–max, в скобках – число измерений. План пещер составлен на основе топоосъемок С. Малахова и др. (2003 г.), К.Е. Васюкевича и др. (2009–2011 г.) и карты из архива Ю.С. Ляхницкого (Малахов и др., 2010); уточнения внесены А.В. Разыграевым и В.В. Гордеевым (2019–2020 г.).

Условные обозначения: жирные стрелки – входы в систему (в левой части – два входа в пещеру Жемчужная, в средней – два входа в пещеру Псевдо-Санта-Мария, в правой части – вход в пещеру Штаны), жирные черные точки – участки, на которых были найдены зимующие кровососущие комары, * – температура снаружи от пещер (в вечернее время), при которой регистрировались значения температуры внутри пещер.

Figure 2. Temperature values in the near-entrance and deep parts of the “Zhemchuzhnaya-Shtany” cave system.

Measurements of temperature were performed during 5 days in an evening time (from 17:30 to 22:00) in the period from December, 2019, to March, 2020. Temperature is in Celsius’ degrees. The medians are designated by a large font, the min–max range is designated by a font of smaller size, the number of measurements in the same site is indicated in parentheses.

The scheme is drawn up using cave maps originally performed by S. Malakhov et al. in 2003 and K.E. Vasyukevich et al. in 2009–2011; the map from Yu.S. Lyakhnitsky’s archive was also used; modifications were made by A.V. Razygraev and V.V. Gordeev in 2019–2020.

Designations: arrows – entries in the cave system (left area – two entries in the Zhemchuzhnaya cave, central area – two entries in the Pseudo-Santa-Maria cave, right area – entry in the Shtany cave), black dots – locations where overwintering mosquitoes were found, * – temperature outside (in evening), when temperature inside caves was measured.



Рисунок 3. Скопление самок рода *Culex* в углублениях поверхности песчаника в привходовой части пещеры Жемчужная.

Figure 3. Concentration of *Culex* females in cavities of the sandstone surface; near-entrance part of the Zhemchuzhnaya Cave.

О резком преобладании *Cs. annulata* над *Cs. alaskaensis* среди самок в привходовых частях Саблинских пещер в ноябре 2019 – начале января 2020 г. упоминалось ранее (Разыграев, 2020). Дополнительный подсчет 18 января 2020 г. в привходовой части пещеры Жемчужная (сплошное обследование) выявил 51 самку *Cs. annulata* и 3 самки *Cs. alaskaensis* (соотношение 17 : 1), а в привходовой штольне пещеры Штаны, закрытой оползнем, – 15 самок *Cs. annulata* и 1 самку *Cs. alaskaensis* (соотношение 15 : 1). Гипотеза о том, что частоты *Cs. annulata* и *Cs. alaskaensis* равны, опровергается для обеих пещер при высоких уровнях значимости ($p = 2.919 \times 10^{-12}$ и 5.188×10^{-4} , соответственно; точный биномиальный тест). При равномерных сборах самок *Cx. pipiens* / *torrentium* в четырех привходовых частях пещер в первой половине декабря 2019 г. и в конце февраля 2020 г. были получены следующие результаты по соотношению между численностью *Cx. pipiens* и численностью *Cx. torrentium*. По морфометрическому индексу $r_{2/3} / r_3$ из 123 собранных самок *Cx. pipiens/torrentium* 78 получили сильное свидетельство в пользу их принадлежности к *Cx. pipiens* ($BF_{01} > 10$), а 29 – к *Cx. torrentium* ($BF_{01} < 0.1$). Здесь BF_{01} – байесовский фактор в пользу гипотезы *Cx. pipiens*, т. е. во сколько раз вероятнее, что особь принадлежит виду *Cx. pipiens*, нежели *Cx. torrentium* (Разыграев, Шулешко, 2018). Остальные 16 особей получили слабое или средней силы свидетельство в пользу одного из двух видов ($0.1 < BF_{01} < 10$) – они далее не рассматривались при расчете соотношения между *Cx. pipiens* и *Cx. torrentium* (Разыграев, Шулешко, 2018). Самки, получившие сильное свидетельство в пользу *Cx. pipiens*, преобладали над самками, получившими сильное свидетельство в пользу *Cx. torrentium*, примерно в 2.7 раза (при этом предполагается, что среди 16 особей с $0.1 < BF_{01} < 10$ соотношение между двумя видами то же самое). Гипотеза о том, что частоты двух видов равны, опроверглась с $p = 2.352 \times 10^{-6}$ (точный биномиальный тест для 107 комаров, из которых 78 – *Cx. pipiens*, а 29 – *Cx. torrentium*). Декабрьские и февральские результаты были объединены перед статистическим сравнением частоты *Cx. pipiens* с частотой *Cx. torrentium* в общей численности, поскольку по соотношению

между *Cx. pipiens* и *Cx. torrentium* декабрьская и февральская выборки не различаются (байесовский критерий в пользу нулевой гипотезы для таблицы сопряженности «*Cx. pipiens* – *Cx. torrentium*, декабрь–февраль» равен приблизительно 3).

Из гистограммы на рис. 4 также хорошо заметно, что самки с небольшими значениями индекса (*Cx. pipiens*) явно преобладают над самками с высокими значениями индекса (*Cx. torrentium*). Два максимума практически идентичны таковым, полученным ранее для самок *Cx. pipiens* и *Cx. torrentium* в работе Böstler et al. (2014). Преобладание *Cx. pipiens* над *Cx. torrentium* согласуется с данными, полученными на самцах в сентябре–октябре 2019 г. для той же местности (Разыграев, 2020).

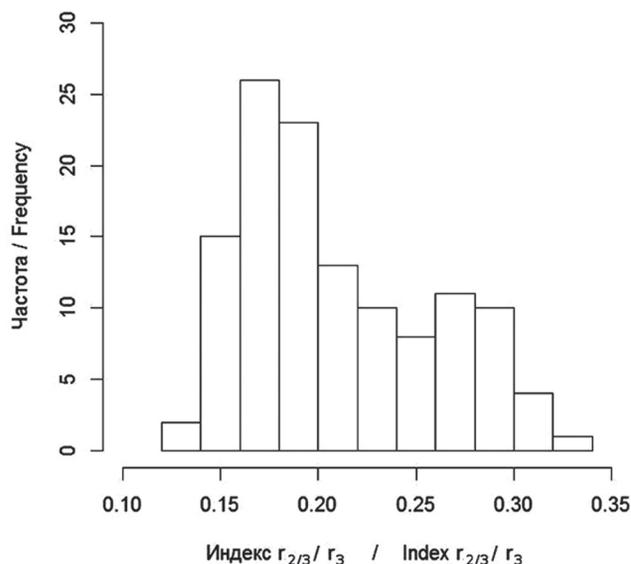


Рисунок 4. Частотная гистограмма распределения индекса $r_{2/3} / r_3$ для самок *Cx. pipiens* / *torrentium*, собранных в Саблинских пещерах 9 декабря 2019 г. и 29 февраля 2020 г. Декабрьские и февральские результаты объединены (общее число особей составляет 123 шт.). Частота представлена абсолютным числом особей.

Figure 4. Frequency histogram of the $r_{2/3} / r_3$ index distribution for *Cx. pipiens* / *torrentium* females collected in the Sablino caves in December 9, 2019 and February 29, 2020.

The December and February samples were combined with each other to present the data in histogram (the total number of specimens is 123). Frequency is in absolute numbers of specimens.

Из 124 равномерно собранных самок рода *Culex*, среди которых проверялось соотношение между *Cx. pipiens* и *Cx. torrentium*, всего один экземпляр (из декабрьского сбора в главной привходовой части пещеры Жемчужная) был представлен видом *Cx. territans*. Осенью 2019 г. автор активно и целенаправленно собирал самок *Cx. territans* в привходовой части пещеры Жемчужная для другого исследования, и, вероятно, подавляющее большинство самок этого вида было собрано. Таким образом, *Cx. territans*, третий вид из рода *Culex*, не вносил значимого вклада в общее число зимующих самок рода *Culex* в обследованной части.

Проведенная оценка пропорций между видами показала, что среди самок *Culiseta* и *Culex*, зимующих в Саблинских пещерах, преобладают виды *Cs. annulata* и *Cx. pipiens*.

Это означает, что дальнейшее сравнение Cs_{\max} и Cx_{\max} (основное в данной работе) относится к участкам максимальных скоплений самок *Culiseta* и *Culex*, представленных преимущественно видами *Cs. annulata* и *Cx. pipiens*, соответственно.

В период с 10 января по 29 февраля 2020 г. проведены измерения температуры и влажности воздуха в Cs_{\max} и Cx_{\max} (Табл. 1) с последующим статистическим сравнением Cs_{\max} и Cx_{\max} по двум данным показателям. При попарном сравнении значений температуры в Cs_{\max} и Cx_{\max} в одних и тех же зимовочных убежищах ($n = 11$) выявилось значимое различие: температура на участке с максимальной плотностью самок рода *Culiseta* в среднем (и по медиане) на 1.6 °C ниже, чем на участке с максимальной плотностью самок рода *Culex* ($p = 0.0039$ после применения поправки Холма-Бонферрони). Аналогично, статистически значимо различаются значения влажности – почти во всех случаях на участках максимального скопления самок рода *Culiseta* влажность была ниже, чем на участках с максимальной плотностью самок рода *Culex*: средняя разница для Cs_{\max} и Cx_{\max} составила 9.4 %, медиана – 9.0 % ($p = 0.0051$). Байесовские факторы в пользу гипотезы о различии между Cs_{\max} и Cx_{\max} по температуре: Scaled JZS Bayes factor – 47.20, Scaled-Information Bayes factor – 48.14. Аналогично по влажности: Scaled JZS Bayes factor – 27.76, Scaled-Information Bayes factor – 31.25 (используемый байесовский калькулятор на основе программного пакета BayesFactor рассчитывает сразу 2 вида байесовского критерия, $r_{\text{scale}} = 0.707$). Байесовские факторы превышают значение 10, т. е. для обоих показателей (и температуры, и влажности) получены сильные свидетельства в пользу альтернативной гипотезы (Kass, Raftery, 1995). Из Табл. 1 хорошо видно, что почти во всех случаях значения для Cs_{\max} ниже, чем для Cx_{\max} , и только в одном случае (помечено знаком *) разница между Cs_{\max} и Cx_{\max} является положительной по каждому параметру, т. е. когда значение температуры/влажности для Cs_{\max} выше, чем для Cx_{\max} . Результаты указывают на то, что в целом самки рода *Culiseta*, по сравнению с самками рода *Culex*, действительно занимают более прохладные участки зимовочных убежищ, где зачастую отмечается более низкая влажность воздуха.

Также между температурой и влажностью воздуха, измеренными в местах скопления комаров, была выявлена статистически значимая связь: значения температуры и влажности воздуха положительно коррелируют друг с другом, коэффициенты корреляции Пирсона и Спирмена составили, соответственно, 0.62 и 0.65 при $n = 34$ (17 пар значений для Cs_{\max} и 17 пар значений для Cx_{\max} , рис. 5) ($p < 0.0001$ для обоих коэффициентов).

ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущих работах мы упоминали, что самки кровососущих комаров относительно многочисленны в пещерах в начале зимовки, а в конце зимовки их численность существенно сокращается. Так, данные обследования четырех тестовых площадок показали, что в течение зимы 2018–2019 гг. количество самок *Culiseta* сократилось в 6 раз, а самок *Culex* – в 6.77 раз (Razygraev, 2020). При этом в конце зимы и весной самок *Culiseta* обнаружить было затруднительно, что связано, по-видимому, с их исходно меньшей численностью по сравнению с численностью самок *Culex* (Razygraev, 2020). В 2019–2020 гг. в течение всей зимы (в противоположность предыдущим зимам) самки *Culiseta* оставались относительно многочисленными, что позволило найти достаточное количество участков их скопления и оценить на этих участках температуру и влажность воздуха.

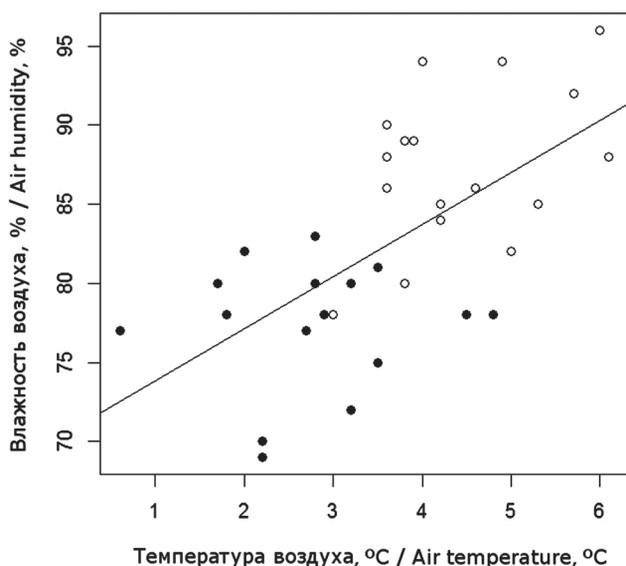


Рисунок 5. Связь между значениями температуры и влажности воздуха, полученными для мест скопления комаров.

Условные обозначения: кружки с заливкой – значения для Cs_{max} , кружки без заливки – значения для Cx_{max} . Парные связи между значениями см. в Табл. 1.

Figure 5. Correlation between air temperature and humidity measured in sites of maximum concentration of hibernating mosquitoes.

Designations: filled circles – values for Cs_{max} , not filled circles – values for Cx_{max} . The links between Cs_{max} and Cx_{max} given in Table 1.

Большое количество самок *Culiseta*, а также первые находки в пещерах самок *Anopheles maculipennis* s. l. в середине и в конце зимы, могут быть объяснены мягкой зимой, без сильных и продолжительных морозов (рис. 6). Соответственно, привходные части пещер со времени ухода комаров на зимовку почти или совсем не промораживались. Это, возможно, объясняет высокую численность самок кровососущих комаров в пещерах в целом за весь период проведения измерений в Cs_{max} и Cx_{max} .

В исследовании, выполненном в сентябре–октябре 2019 г. на самцах, ищущих убежища в пещерах при понижении температуры внешнего воздуха, было получено статистическое обоснование различия в температурных требованиях между видами кровососущих комаров из родов *Culiseta* и *Culex*. Самцы рода *Culiseta* (преимущественно *Cs. annulata*) были сравнительно малочисленны в привходных частях пещер при наружных температурах воздуха от +5 до +8 °C и сравнительно многочисленны в тех же частях пещер при наружных температурах от +1 до +3 °C. В тех же интервалах наружных температур самцы *Culex* (преимущественно *Cx. pipiens*) в пещерах одинаково многочисленны. При этом получено свидетельство в пользу сочетанного влияния снижения влажности и температуры наружного воздуха, повышающего долю самцов *Culiseta* среди общего количества самцов *Culiseta* и *Culex* в убежищах.

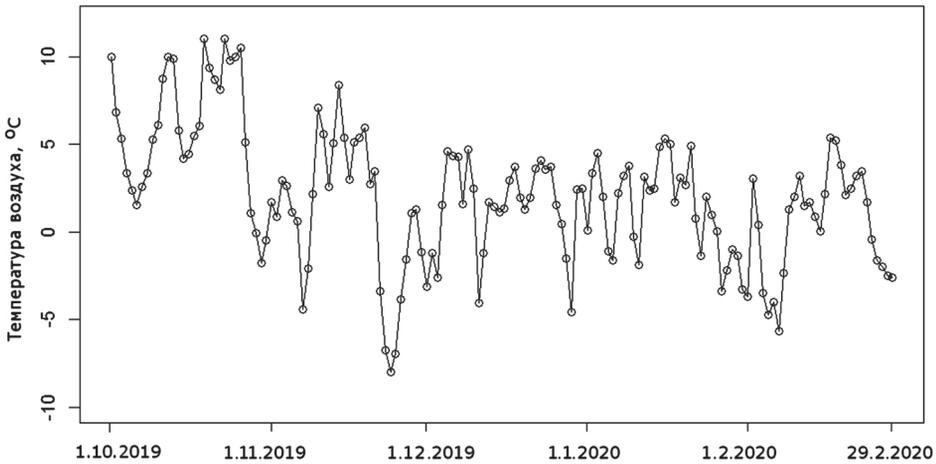


Рисунок 6. Среднесуточная температура воздуха с октября 2019 г. по февраль 2020 г. по данным метеостанции в Пулково, южная часть Санкт-Петербурга (59.81°N, 30.27°E) (The Weather Company, 2020).

Figure 6. Daily average air temperature from October 1, 2019 until February 29, 2020, based on data from the Pulkovo meteo station (Southern Saint-Petersburg, 59.81°N, 30.27°E) (The Weather Company, 2020).

Аналогично исследованию, выполненному на взрослых самцах, настоящее исследование, проведенное на взрослых самках, также подтверждает различия в требованиях к температуре и/или влажности между *Cs. annulata* и *Cx. pipiens*, т. е. между доминирующими видами из двух родов. Средняя разница температур между Cx_{max} и Cs_{max} составила всего 1.6 °C, однако результат статистически значимый. Можно сделать вывод о небольших различиях в температурных требованиях между самками *Cs. annulata* и *Cx. pipiens*. Различие по влажности воздуха составило 9.4 %, и оно лишь незначительно уступает по статистической значимости различию в температуре воздуха. Вероятно, незначительные по величине снижения температуры и влажности в совместном убежище самок *Culiseta* и *Culex* заставляют самок *Culex* перемещаться в более теплые и влажные места, тогда как самки *Culiseta* все еще склонны оставаться в тех участках убежищ, которые были заняты ими ранее. Не исключено также, что у самок *Culex*, уже находящихся в состоянии холодного оцепенения, несколько выше смертность в местах с более низкой температурой и влажностью воздуха, что может быть проверено в дальнейшем. Поскольку выявлена значимая положительная корреляция между значениями температуры и влажности воздуха на участках скопления самок комаров, можно предполагать, что основным фактором, влияющим на распределение самок, является только температура или только влажность воздуха, но возможно и их сочетанное влияние.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании показано, что самки рода *Culiseta*, зимующие в одних и тех же убежищах с самками рода *Culex*, занимают, как правило, более прохладные участки убежищ, имеющие зачастую более низкие значения влажности воздуха. Косвенно под-

тверждается более высокая приспособленность самок рода *Culiseta* (преимущественно, *Cs. annulata*) к снижениям температуры и влажности по сравнению с самками рода *Culex* (преимущественно, *Cx. pipiens*).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена частично при финансовой поддержке Государственной темы «Разработка современных основ систематики и филогенетики паразитических и кровососущих членистоногих» (гос. рег. № АААА-А19-119020790133-6), собранные и определенные экземпляры комаров помещены в коллекцию Зоологического института РАН (ЗИН РАН, Санкт Петербург) (УФК ЗИН рег. № 2-2.20). Автор признателен анонимным рецензентам за полезные замечания и вопросы: при ответах на них было существенно расширено описание методов и результатов. Автор благодарит студентов Института наук о Земле Санкт-Петербургского государственного университета В.О. Бунина, С.Г. Каменкову и А.И. Гришнякову за помощь при измерении температуры и влажности воздуха в привходовых и глубинных залах пещер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гуцевич А.В., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. 1970. Комары. Семейство Culicidae. Фауна СССР. Насекомые двукрылые, 3 (4), Ленинград, Наука, 384 с. [Gutsevich A.V., Monchadsky A.S., Stackelberg A.A. 1970. Fauna SSSR. Nasekomye dvukrylye (Fauna of the USSR. Insecta, Diptera), Vol. 3, Issue 4: Komary sem. Culicidae (Mosquitoes, Family Culicidae), Leningrad: Nauka, 384 p. (in Russian)]
- Малахов С., Шестакова К., Козлов А., Слепнева Т.Н. 2010. Саблино. Карты Саблинских пещер. Режим доступа: <http://www.sablino.ru/cave/cavenav.htm> (15 апреля 2019)
- Разыграев А.В. 2020. Численность самцов *Culiseta* и *Culex* (Diptera, Culicidae) в привходовых частях пещер как отражение их различной устойчивости к низкой температуре наружного воздуха. Паразитология 54 (2): 137–144. [Razygraev A.V. 2020. Abundance of male mosquitoes of the genera *Culiseta* and *Culex* (Diptera, Culicidae) in near-entrance parts of caves as a reflection of their different tolerance to low outdoor temperatures. Parazitologiya 54 (2): 137–144 (in Russian)] DOI: 10.31857/S1234567806020042
- Разыграев А.В., Шулешко Т.М. 2018. Использование фактора Байеса для определения видов *Culex pipiens* и *Culex torrentium* (Diptera: Culicidae) по морфометрическим характеристикам крыла. Паразитология 52 (4): 304–314. [Razygraev A.V., Sulesco T.M. 2018. The use of Bayes factor for the identification of *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Diptera: Culicidae) by morphometric wing characters. Parazitologiya 52 (4): 304–314 (in Russian)] DOI: 10.7868/S0031184718040054
- Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C., Kaiser A. 2010. Mosquitoes and Their Control. Second Edition. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 608 pp.
- Börstler J., Lühken R., Rudolf M., Steinke S., Melaun C., Becker S., Garms R., Krüger A. 2014. The use of morphometric wing characters to discriminate female *Culex pipiens* and *Culex torrentium*. Journal of Vector Ecology 39 (1): 204–212. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2014.12088.x>
- Dienes Z. 2008. Making the most of your data with Bayes. Режим доступа: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Zoltan_Dienes/inference/Bayes.htm (17 апреля 2020)
- Hesson J.C., Rettich F., Merdic E., Vignjevic G., Ostman O., Schäfer M., Schaffner F., Foussadier R., Besnard G., Medlock J., Scholte E.J., Lundström J.O. 2014. The arbovirus vector *Culex torrentium* is more prevalent than *Culex pipiens* in northern and central Europe. Medical and Veterinary Entomology 28 (2): 179–186. <https://doi.org/10.1111/mve.12024>
- Kass R.E., Raftery A.E. 1995. Bayes factors. Journal of the American Statistical Association 90 (430): 773–795. DOI: 10.1080/01621459.1995.10476572
- Morey R.D., Roudier J.N., Jamil T., Urbanek S., Forner K., Ly A. 2018. BayesFactor: computation of Bayes factors for common designs. Режим доступа: <https://cran.r-project.org/web/packages/BayesFactor/index.html> (17 апреля 2020)
- R Core Team 2019. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing. Режим доступа: <https://www.R-project.org/> (25 февраля 2020)

- Razygraev A.V. 2020. A comparative study of catalase activity in *Culiseta annulata* (Schrank) and *Culex pipiens* L. (Diptera, Culicidae). *Entomological Review* 100 (2): 162–169. <https://doi.org/10.1134/S0013873820020037>
- Skierska B. 1965. Ecological studies of the occurrence and distribution of Culicinae fauna in the coastal forest belt. *Ekologia Polska Ser. A* 13: 527–573.
- The Weather Company. 2020. Weather Underground. Historical weather. Режим доступа: <https://www.wunderground.com/history> (19 мая 2020)
- Wegner E. 2009. The characteristics of the most troublesome mosquito species (Diptera: Culicidae) in Poland. *Fragmenta Faunistica* 52 (2): 157–179. doi: 10.3161/00159301FF2009.52.2.157
- WRBU (The Walter Reed Biosystematics Unit). Режим доступа: <https://web.archive.org/web/20070622165007/http://wrbu.si.edu/GeneraPages/culiseta.htm> (8 апреля 2020)

DIFFERENCE IN THE DISTRIBUTION OF OVERWINTERING FEMALE
MOSQUITOES OF THE GENERA *CULEX* AND *CULISETA* (DIPTERA, CULICIDAE)
IN NEAR-ENTRANCE PARTS OF CAVES IN RELATION
TO AIR TEMPERATURE AND HUMIDITY

A. V. Razygraev

Keywords: mosquitoes, hibernacula, temperature, humidity, *Culiseta annulata*, *Culex pipiens*, Culicidae, Sablino Caves

SUMMARY

Data on differences in ecological needs of mosquitoes of different genera and species at different stages of the life cycle are important for the explanation of their distribution in regions with different climate and can also be compared with differences in their physiological characteristics. In the present paper, air temperature and humidity were measured in sites of maximum density of adult mosquito females of the genera *Culex* and *Culiseta*, overwintering in near-entrance parts of Sablino Caves (Northwestern Russia). Overwintering together, *Culex* females (predominantly *Cx. pipiens*) concentrated, in general, in warmer places than *Culiseta* females (mainly *Cs. annulata*). The mean difference in temperature between sites of maximum density of *Culex* and *Culiseta* females was 1.6 °C ($p = 0.0039$, Wilcoxon signed rank test; the Bayes factor in favor of alternative (BF_{10}) was more than 40). In general, humidity was also higher in sites of maximum density of *Culex* females in comparison with those of *Culiseta* females – the mean difference constituted 9.4 % ($p = 0.0051$, the BF_{10} is more than 20). These results support a hypothesis on the different temperature and/or humidity requirements of *Cx. pipiens* and *Cs. annulata*: the latter species may be considered as better adapted to low temperature and/or low humidity. Probably, when temperature and humidity fall in near-entrance parts of caves, *Culiseta* females tend to stay in sites occupied earlier, while females of *Culex* migrate to neighbor sites with higher temperature and humidity.

УДК 595.772

К ОСОБЕННОСТЯМ РАЗВИТИЯ КУКОЛОЧНОЙ ФАЗЫ СЛЕПНЕЙ (DIPTERA, TABANIDAE) СЕВЕРО-ЗАПАДА РОССИИ

2020 г. В. В. Агасой*

Псковский государственный университет,
пл. Ленина, д. 2, Псков, 180000 Россия
*e-mail: agasoi_87@mail.ru

Поступила в редакцию 28.08.2020 г.

После доработки 23.11.2020 г.

Принята к печати 27.11.2020 г.

Экспериментально изучены особенности развития куколочной фазы слепней на примере табанид Псковской области. Исследована зависимость продолжительности фазы куколки от температуры. Установлено, что в стабильных лабораторных условиях продолжительность развития куколок одного и того же вида, полученных из личинок, собранных в год проведения наблюдений, характеризуется значительными колебаниями. Для куколок, полученных из личинок, зимовавших в лабораторных условиях, отмечен минимальный разброс сроков развития. Обсуждаются причины этих различий.

Ключевые слова: Tabanidae, слепни, продолжительность фазы развития, личинки, куколки, местообитание

DOI: 10.31857/S0031184721010051

Слепни (Tabanidae) относятся к кровососущим двукрылым насекомым. Бóльшая часть жизненного цикла слепней приходится на преимагинальные фазы (яйцо, личинка и куколка). При этом длительность этих фаз у разных видов различна и может существенно колебаться. Один из ведущих факторов, определяющих эти различия – температура (Cameron, 1926; Segal, 1936a; b; Скуфьин, 1973; Лутта, 1970; Павлова, 1974; Лутта, Быкова, 1982; Атнагулова, 2008). На северо-западе России исследования, посвящённые изучению продолжительности преимагинальных фаз слепней, проводились Лутта (1970). Показано, что в лабораторных условиях полное развитие куколки вида *Chrysops caecutiens caecutiens* (L., 1758) занимает от 8 до 20 дней, *Hybomitra montana montana* (Meigen, 1820) – от 8 до 21 дня и *Haematopota pluvialis pluvialis* (L., 1758) – от 13 до 24 дней.

Темпы развития куколочной фазы определяют сроки и интенсивность лёта имаго, что в свою очередь оказывает влияние на жизненный цикл слепней в целом. Поэтому целью настоящего исследования стало изучение влияния температуры на продолжительность куколочной фазы некоторых видов слепней Псковской области.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования послужили куколки 13 видов слепней: *Atylotus fulvus fulvus* (Meigen, 1820), *Chrysops c. caecutiens* (L., 1758), *Ch. viduatus* (Fabricius, 1794), *Hybomitra bimaculata* (Macquart, 1826), *H. ciureai* (Seguy, 1937), *H. distinguenda distinguenda* (Verrall, 1909), *H. lundbecki lundbecki* (Lyneborg, 1960), *H. lurida* (Fallen, 1817), *H. muehlfeldi* (Brauer, 1880), *H. nitidifrons confiformis* (Szilady, 1914), *Tabanus bovinus* (L., 1758), *T. cordiger* (Meigen, 1820) и *T. maculicornis* (Zetterstedt, 1842).

Для получения куколок проводили сбор личинок слепней на специально выбранном модельном участке, расположенном в окрестностях д. Молоди (58.022777–28.705967) Струго-Красненского района Псковской области. Здесь было выделено 4 типа личиночных стадий (термин предложен Лутта, 1970), которые относятся к наиболее типичным местам обитания преимагинальных фаз развития слепней: берег стоячего водоема эвтрофного типа (далее станция 1), заболоченные участки влажно-разнотравного луга (далее станция 2), заброшенная мелиоративная канава (далее станция 3) и берег р. Псковы (далее станция 4) (Рис. 1).

Станция 1 расположена в 1 км от деревни и находится в мелколиственном лесу (Рис. 1А). В лесном массиве преобладают береза повислая и осина. Под ними встречается крушина ломкая, ольха серая, лещина обыкновенная. С юго-западной стороны водоема по берегу образовались заросли ольхи серой и ивы ломкой. Мелколиственный лес относится к станции полузакрытого типа. Берег водоема пологий с богатой прибрежной растительностью, в которой преобладают осоки, злаки, рогоз, гипновые мхи, и с многочисленной фауной беспозвоночных (олигохет, моллюсков и т. д.). Значение водородного показателя (рН), в зоне ниже 10 см от уреза воды, находилось в пределах от 6.5 до 7.3, а в зоне выше 10 см от уреза воды – 6.5–6.9. Температура поверхностных слоёв и моховой массы проб в мае составила 14–16 °С, в раннелетний период – 17–19 °С. Ранее данный водоём использовали как место водопоя крупного рогатого скота. Здесь обнаружены личинки *Atylotus f. fulvus*, *Chrysops viduatus*, *Hybomitra bimaculata*, *H. ciureai*, *H. l. lundbecki*, *H. lurida*, *H. muehlfeldi*, *H. nitidifrons c.*, *Tabanus bovinus* и *T. maculicornis*. Из этих личинок в лабораторных условиях было получено куколок: *A. f. fulvus* – 3 экз., *Ch. viduatus* – 2 экз., *H. bimaculata* – 32 экз., *H. ciureai* – 11 экз., *H. l. lundbecki* – 16 экз., *H. lurida* – 3 экз., *H. muehlfeldi* – 41 экз., *H. nitidifrons c.* – 2 экз., *T. bovinus* – 1 экз. и *T. maculicornis* – 43 экз.

Станция 2 расположена на проточно-увлажненных почвах и представлена разнотравно-злаковыми ассоциациями растений (Рис. 1Б). Луг принадлежит к станции открытого типа. На нём в изобилии развивается луговик дернистый, бодяк разнолистный, колокольчик раскидистый, лабазник вязолистный, лютик едкий, щавель кислый, камыш лесной, герань луговая. В понижениях луга расположены заболоченные участки, которые покрыты гипновыми мхами и окружены кустарниками ивы ломкой. Значение рН поверхностного слоя заболоченных участков луга в пределах от 4.0 до 4.5. Температура поверхностных слоёв и моховой массы проб в мае составляла 16–18 °С, а в раннелетний период – 19–21 °С. Здесь были собраны личинки слепней следующих видов: *Chrysops viduatus*, *Hybomitra bimaculata*, *H. d. distinguenda*, *H. l. lundbecki*, *H. muehlfeldi*, *H. nitidifrons c.*, *Tabanus bovinus* и *T. maculicornis*. Из этих личинок в лабораторных условиях было получено куколок: *Ch. viduatus* – 2 экз., *Hybomitra bimaculata* – 5 экз., *H. d. distinguenda* – 1 экз., *H. l. lundbecki* – 5 экз., *H. muehlfeldi* – 3 экз., *H. nitidifrons c.* – 1 экз., *Tabanus bovinus* – 2 экз. и *T. maculicornis* – 2 экз.

Станция 3 является непроточным эвтрофным водоёмом (Рис. 1В). Рядом с ней расположен торфяник. С восточной стороны данная канава имеет крутой склон, на котором произрастают древесные породы – береза повислая и осина, а также многочисленные кустарниковые породы – ольха серая, лещина обыкновенная. С западной стороны канава ограничена от суходольного луга полосой из кустарниковых пород. Данный участок является станцией закрытого типа. Берега и дно канавы покрыты большим количеством растительных остатков (опавшими листьями и ветками кустарников). Значение рН поверхностного слоя грунта мелиоративной канавы в пределах от 7.2 до 7.5. Температура поверхностных слоёв грунта в мае составляла 10–12 °С, а в раннелетний период – 14–16 °С. Обнаруженные в этой станции личинки относятся к видам

Chrysops viduatus, *Hybomitra bimaculata*, *H. ciureai*, *H. d. distinguenda*, *H. l. lundbecki* и *Tabanus maculicornis*. Из этих личинок в лабораторных условиях было получено куколок: *Ch. viduatus* – 2 экз., *H. bimaculata* – 3 экз., *H. ciureai* – 1 экз., *H. d. distinguenda* – 16 экз., *H. l. lundbecki* – 1 экз. и *Tabanus maculicornis* – 1 экз.

Стация 4, в месте сбора личинок, представлена песчаным слабо заиленным дном (Рис. 1Г). На этом участке река изгибается, имеет небольшую глубину и слабое течение из-за наличия запруды. В местах взятия проб температура поверхностных слоёв грунта в мае составляла 10–12 °С и значение водородного показателя – 6.5. В данной станции отмечены личинки, принадлежащие к 3 видам слепней – *Chrysops c. caecutiens*, *Hybomitra muehlfeldi* и *Tabanus cordiger*. Из этих личинок в лабораторных условиях было получено куколок: *Chrysops c. caecutiens* – 146 экз. и *Tabanus cordiger* – 3 экз.



Рисунок 1. Места сбора личинок слепней в окрестностях д. Молоди Струго-Красненского района Псковской области. *А* – стоячий водоем эвтрофного типа, *Б* – влажно-разнотравный луг, *В* – заброшенная мелиоративная канава, *Г* – левый берег р. Пскова.

Figure 1. Collecting sites of horsefly larvae in environs of Molody Village, Strugo-Krasnensky district, Pskov Province. *A* – stagnant eutrophic reservoir, *B* – wet-grass meadow, *C* – abandoned reclamation ditch, *D* – the left bank of the Pskov River.

Сбор материала проводили на протяжении 9 лет (2011–2013 и 2015–2020 г.г.). При этом использовали методику, предложенную Скуфьиным (1973). В выбранных станциях материал собирали: в 2011 г. во второй и третьей декадах июня, в течение всего июля, во второй и в третьей декадах августа; в 2012 г. в третьей декаде июня, во второй декаде июля и в первой декадах августа; в 2013 г. в первой декаде июня; с 2015 по 2020 г. в первой и третьей декадах мая.

Поскольку личинки в мае во всех местах сбора располагались на глубине 5–8 см, при их поиске снимали поверхностный слой субстрата толщиной не более 10 см. Отбор почвы, грунта, моховой или торфянистой массы проводили металлической лопатой, совком или граблями. Собранный мох раскладывали в сухом месте на клеенке и небольшими порциями тщательно перебирали руками. Тяжелые глинистые почвы, растительные остатки (опавшие листья и перергной), песчаные и илистые грунты промывали через два металлических сита, поставленных друг на друга. Размер ячеек верхнего сита 10×10 мм, нижнего сита – 1.7×1.7 мм.

Инкубацию исследуемых личинок и куколок проводили в стабильных лабораторных условиях при температуре 19–21 °С (2011–2013 г., 2015–2017 г.) и 16–18 °С (2018–2020 г.). При этом личинок, предназначенных для получения куколок, поодиночке размещали в пластмассовые стаканы объёмом 100–120 мл, на дно которых укладывали субстрат с места сбора и наливали немного воды. Отверстие стакана затягивали бязью и закрепляли резинкой. Хищных личинок 1 раз в 5 дней подкармливали личинками комара-звонца или нарезанными кусочками дождевого червя. Субстрат заменяли на свежий через 10–12 дней. После вылета взрослой особи личиночную шкурку фиксировали в 70 % спирте, экзувий куколки сохраняли и подкалывали под выведенный экземпляр имаго. Вылетевшие имаго использовались для определения видовой принадлежности личинок и куколок.

Всего было собрано 784 личинки, из которых в лабораторных условиях удалось вывести 447 имаго, остальные личинки и куколки погибли (337). Среди собранного материала на стацию 1 пришлось 492 личинки, стацию 2 – 81 личинка, стацию 3 – 41 личинка, стацию 4 – 170 личинок.

В 2011–2013 г. сбор личинок проводили в летние месяцы, поэтому при содержании в стабильных лабораторных условиях при температуре 19–21 °С и естественном освещении (на подоконнике) они не приступали к окукливанию до конца осени. Они лишь успевали пройти от 1 до 3 линек до наступления зимнего периода. Затем их переводили на перезимовку. Для этого личинок в период с 1 декабря по 1 марта помещали в холодильную камеру в темноте при температуре 4 °С. Во время зимовки личинок не кормили, а только контролировали влажность субстрата. В марте личинок извлекали из холодильной камеры и вновь помещали в лаборатории на подоконник при температуре 19–21 °С. Этим личинок периодически подкармливали, меняли субстрат и контролировали его влажность. Всего зимовавших личинок было 279.

Личинки, собранные в 2015–2020 г.г., в стабильных лабораторных условиях успевали пройти цикл развития до вылета имаго. Таких личинок было 505. Их содержали в лаборатории на подоконнике при температуре 19–21 °С (2015–2017 г.г. сбора) и 16–18 °С (2018–2020 г.г. сбора). Все эти личинки были собраны на предкуколичной стадии, т.к. после их окукливания в субстрате обнаруживалась только личиночная шкурка с ротовым аппаратом.

Согласно литературным данным (Лутга, 1970; Павлова, 1974) продолжительность развития личиночной фазы определяется в первую очередь температурой, которая также может оказывать существенное влияние на длительность куколичной фазы. Поэтому для выявления связи температуры окружающей среды с темпами развития куколичной фазы были определены среднедекадные температуры воздуха в период сбора личинок и в декаду, предшествующую сбору. Среднедекадную температуру рассчитывали по данным метеостанции Струги-Красные, на которой замеры температуры проводились четыре раза в сутки.

Во время сбора материала измерения температуры и pH субстрата производили при помощи анализатора почв «Soil Survey Instrument, model: KC-300».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наблюдения за продолжительностью куколочной фазы исследованных видов показали, что у разных видов ее длительность в одинаковых условиях различна.

Личинки *Hybomitra l. lundbecki*, *H. muehlfeldi*, *H. ciureai*, собранные в первой декаде мая 2015–2020 г., в лабораторных условиях приступали к окукливанию в период со второй декады мая по первую декаду июня. При этом продолжительность собственно куколочной фазы у личинок *H. l. lundbecki* составила 3–17 дней, у *H. muehlfeldi* – 4–19 дней и у *H. ciureai* – 6–14 дней. Личинки *H. muehlfeldi* и *H. ciureai*, собранные в третью декаду мая, окукливались с конца третьей декады мая по середину первой декады июня. Продолжительность фазы куколки для этих личинок составила 8–10 дней. Личинки *H. bimaculata*, собранные в первую декаду 2016 и 2017 г., окукливались во вторую декаду мая и находились в этой фазе от 4 до 10 дней. Личинки этого же вида, собранные в первой декаде мая 2015 г., в 2018–2020 гг., окукливались в период со второй декады мая по начало первой декады июня. Продолжительность фазы куколки составила 12–20 дней. Личинки *H. lurida*, собранные в первой декаде мая 2017 и 2019 г., приступали к окукливанию в третью декаду мая, а длительность их куколочной фазы составила 12–14 дней.

Личинки *Tabanus cordiger* в период наблюдений встретились всего один раз в первой декаде мая 2019 г. в количестве двух экземпляров. Одна из этих личинок окуклилась в третью декаду мая, другая – вторую декаду июня. Их куколочная фаза длилась 15 и 23 дня соответственно. Личинки *T. maculicornis*, собранные в первую декаду мая 2015 г. и в 2017–2020 гг., окукливались во вторую и третью декады мая, а фаза куколки составила 4–18 дней.

В первой декаде мая 2013, 2017 и 2019 г. в станции 1 в слое мха на древесных остатках были обнаружены личинки *Atylotus f. fulvus* приступившие к окукливанию в третьей декаде мая. Их куколочная фаза продолжалась от 14 до 20 дней.

Личинки *Chrysops c. caecutiens*, собранные в первой декаде мая и июня 2017 г., окукливались в период с третьей декады мая по вторую декаду июня, а фаза их куколки составляла 5–10 дней. Личинки *Ch. viduatus*, собранные в первой и третьей декадах мая 2018 и 2020 г., приступали к окукливанию в третью декаду мая и первую декаду июня соответственно. Фаза куколки этого вида составила 6–8 дней.

Наблюдения показали, что с увеличением температуры у всех исследованных видов средняя продолжительность куколочной фазы сокращается (Табл. 1). Так, у *H. bimaculata*, содержащейся в лаборатории при температуре 16–18 °С, средняя продолжительность фазы куколки составила от 8.8 до 11.3 дня, при температуре 19–21 °С – от 6.3 до 10.6 дня. Куколочная фаза вида *H. ciureai* при температуре 16–18 °С в среднем развивалась от 9.8 до 12.8 дня, при температуре 19–21 °С – от 7.8 до 11.8 дня.

Вместе с тем для куколок ряда видов отмечены существенные различия в средних темпах их развития в разные годы. Для куколок *H. l. lundbecki* в 2015 г. в одних и тех же лабораторных условиях средняя продолжительность фазы оказалась существенно больше (13.6 дня), чем в 2016 и 2017 г. (от 5.0 до 8.6 дня соответственно). Соответственно в 2019 г. этот показатель составил 13.3 дня, в 2018 г. – 8.7 дня и в 2020 г. – 9.2 дня. Для *H. muehlfeldi* средняя продолжительность куколочной фазы в 2015 г. составила 12.7 дня, в 2016 г. – 7.7 дня, в 2017 г. – 6.4 дня. Соответственно в 2019 г. – 11.8 дня, в 2018 г. – 6.2 дня и в 2020 г. – 7.4 дня. Куколки *Tabanus maculicornis* в 2015 г. в лабораторных условиях развивались 14.4 дня, в 2017 г. – 11.2 дня. Соответственно в 2019 г. – 14.7 дня, в 2018 г. – 9.1 дня и в 2020 г. – 12.2 дня (Табл. 1).

Таблица 1. Зависимость продолжительности кукольной фазы слепней от температурных условий

Table 1. Dependence of the duration of the pupal phase of horseflies on temperature conditions

Температура в лабораторных условиях	Количество куколок	Продолжительность фазы куколки (в днях)			Год исследований	Среднедекадная температура в районе сбора материала	
		наименьшая	наибольшая	средняя		III декада апреля	I декада мая
<i>Hybomitra bimaculata</i>							
16–18 °С	5	8	12	9.4	2020	5.5	11.3
	15	5	14	11.3	2019	12.4	7.4
	12	3	18	8.8	2018	8.5	13.3
19–21 °С	5	7	8	7.4	2017	4	7.1
	9	6	9	6.3	2016	6.5	14.1
	7	4	14	10.6	2015	9.3	10.6
<i>Hybomitra ciureai</i>							
16–18 °С	5	8	14	10.4	2020	5.5	11.3
	5	12	13	12.8	2019	12.4	7.4
	5	7	14	9.8	2018	8.5	13.3
19–21 °С	5	6	11	7.8	2016	6.5	14.1
	5	11	12	11.8	2015	9.3	10.6
<i>Hybomitra l. lundbecki</i>							
16–18 °С	5	7	11	9.2	2020	5.45	11.3
	5	12	14	13.3	2019	12.4	7.4
	5	6	11	8.7	2018	8.5	13.3
19–21 °С	5	7	15	8.6	2017	4	7.1
	5	3	7	5	2016	6.5	14.1
	5	11	16	13.6	2015	9.3	10.6
<i>Hybomitra muehlfeldi</i>							
16–18 °С	5	4	10	7.4	2020	5.5	11.3
	6	11	13	11.8	2019	12.4	7.4
	6	3	9	6.2	2018	8.5	13.3
19–21 °С	8	5	8	6.4	2017	4	7.1
	6	3	16	7.7	2016	6.5	14.1
	17	9	16	12.7	2015	9.3	10.6
<i>Tabanus maculicornis</i>							
16–18 °С	5	12	13	12.2	2020	5.5	11.3
	6	11	18	14.7	2019	12.4	7.4
	31	3	13	9.1	2018	8.5	13.3
19–21 °С	5	4	17	11.2	2017	4	7.1
	5	14	16	14.4	2015	9.3	10.6

Примечания. Для повышения точности результатов приведены сведения только для видов слепней, количество куколок которых было не менее 5. Куколки остальных видов были единичны.

Из 279 личинок, оставленных на перезимовку, выжило лишь 50 экз. (18 %), из которых удалось вывести 30 имаго, принадлежащих к 6 видам: *Atylotus f. fulvus* (1 экз.), *Hybomitra bimaculata* (4 экз.), *H. d. distinguenda* (18 экз.), *H. l. lundbecki* (4 экз.), *H. nitidifrons* c. (1 экз.) и *Tabanus bovinus* (2 экз.). При этом личинки *H. l. lundbecki*, *H. bimaculata* и *H. nitidifrons* c. окукливались в конце второй декады и в третьей декаде марта, их куколочная фаза длилась 8–10 дней, а взрослые особи вылуплялись в третьей декаде марта или первой декаде апреля. Представители *H. d. distinguenda* приступали к окукливанию в период с третьей декады марта по первую декаду апреля, а фаза куколки составила 9–11 дней. Личинка *A. f. fulvus* окуклилась в третьей декаде марта и вылупилась во взрослую особь во второй декаде апреля. Её куколочная фаза продолжалась 20 дней. Личинки *T. bovinus* окукливались во второй декаде апреля или во второй декаде мая и продолжительность фазы их куколки составила 6 и 19 дней.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты показали, что длительность куколочной фазы у одного и того же вида при содержании в стабильных лабораторных условиях характеризуется значительными колебаниями. Вероятно, личинки, собранные для выведения куколок, в момент сбора пребывали в разной степени зрелости предкуколочной стадии. Поэтому в стабильных лабораторных условиях при температурах, оптимальных для перехода к окукливанию (11–29 °С; Лутта, 1970), окукливание начиналось через разные промежутки времени. При этом чем дольше личинка оставалась в предкуколочной стадии, тем короче был срок куколочной фазы и наоборот. Суммарная длительность развития от момента, когда личинку помещали в стабильные лабораторные условия, до вылета имаго для одного и того же вида была практически одинакова для всех особей (Табл. 2).

Проведенные эксперименты позволили отметить следующую закономерность – в целом, для исследованных видов при повышении температуры содержания с 16–18 °С (2018 и 2020 г.г.) до 19–21 °С (2016 и 2017 г.г.) средняя продолжительность фазы куколки сокращается (Табл. 1). Подобная закономерность сокращения сроков развития при повышении температуры характерна для всех пойкилотермных животных, и в этом плане исследованные нами виды подчиняются общему правилу.

Наблюдения показали, что перепады температур, предшествующих периоду сбора личинок, и в период их сбора могут оказывать влияние на продолжительность куколочной фазы в стабильных лабораторных условиях. В частности, в 2015 г. среднедекадные температуры третьей декады апреля (9.3 °С) и первой декады мая (10.6 °С) различались незначительно. При этом сроки развития куколок для разных видов составляли от 10.6 до 14.4 дня (Табл. 1). Вместе с тем, в 2019 г. среднедекадная температура третьей декады апреля составляла 12.4 °С, в первой декаде мая – 7.4 °С, а сроки развития куколки у тех же видов либо незначительно увеличивались, либо оставались на том же уровне, что и в 2015 г. В 2016–2018 гг. и 2020 г., когда среднедекадная температура, предшествующая периоду сбора личинок, была ниже, чем температура в период сбора (колебалась от 4 до 6.5 °С в третьей декаде апреля и от 7.1 до 14.1 °С в первой декаде мая), наблюдалась обратная картина – продолжительность развития куколок уменьшалась (Табл. 1).

Из приведенных выше примеров можно сделать вывод о том, что смена природных температур в сторону повышения от нижнего оптимума развития личинок (5–9 °С; Павлова, 1974) к оптимальным значениям (16–23 °С; Лутта, 1970) в стабильных лабораторных условиях приводит к сокращению сроков развития куколок. Подобные

сведения об ускоряющем влиянии колебаний температур в сторону повышения, по сравнению с темпами развития при константной температуре, имеются в литературе для личинок и куколок не только Tabanidae, но и других Diptera (Ludwig, Cable, 1934; Huffaker, 1944; Лутта, 1970; Павлова, 1974; Ratte, 1985; Tun-Lin et al., 2000; Eisen et al., 2014; Colinet, 2015; Majo, 2019).

Как отмечалось выше, результаты наблюдений показали, что разброс сроков развития куколок зимовавших личинок был минимален (2 дня), по сравнению с куколками, полученными из личинок-сеголеток (разброс от 1 до 15 дней) (Табл. 2).

Таблица 2. Продолжительность личиночной и кукольной фаз до вылета имаго в лабораторных условиях

Table 2. Duration of larval and pupal phases before the emergence of adults in laboratory conditions

Продолжительность личиночной и кукольной фаз (дней)		
личинка	куколка	суммарная
<i>Hybomitra bimaculata</i>		
18	3	21
17	4	21
12	9	21
8	12	20
2	18	20
<i>Hybomitra l. lundbecki</i>		
21	3	24
16	7	23
6	12	18
8	14	22
5	16	21
<i>Hybomitra muehlfeldi</i>		
19	3	22
18	5	23
9	11	20
8	13	21
6	16	22
<i>Hybomitra ciureai</i>		
14	6	20
16	8	20
9	11	20
9	12	21
8	14	22
<i>Tabanus maculicornis</i>		
18	3	21
19	4	23
8	13	21
6	16	22
5	18	23

Можно предположить, что указанные различия связаны с тем, что личинки-сеголетки помещались в стабильные лабораторные условия в разной степени зрелости предкулолочной стадии. Личинки, зимовавшие в экспериментальных условиях, длительное время находились при стабильных температурах, что приводило к синхронизации их развития. Поэтому по выходе из зимовки они оказывались в одинаковой степени зрелости предкулолочной стадии, что и определяло выравнивание продолжительности самой кулолочной фазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Атнагулова Л.З. 2008. Слепни (Diptera, Tabanidae) г. Тобольска и Тобольского района. Тобольск, ТГПИ им. Д. И. Менделеева, 135 с. [Atnagulova L.Z. 2008. Horseflies (Diptera, Tabanidae) of Tobolsk and Tobolsk region. Tobolsk, D.I. Mendeleev Tobolsk State Pedagogical University, 135 p. (in Russian)]
- Лутта А.С. 1970. Слепни Карелии. Ленинград, Наука, Ленинградское отделение, 304 с. [Lutta A.S. 1970. Horseflies of Karelia (Diptera, Tabanidae). Leningrad, Nauka, 304 p. (in Russian)]
- Лутта А.С., Быкова Х.И. 1982. Слепни (Сем. Tabanidae) Европейского Севера. Ленинград, Наука, 184 с. [Lutta A.S., Bykova Kh.I. 1982. Horseflies (Diptera, Tabanidae) of the North of the European USSR. Leningrad, Nauka, 184 p. (in Russian)]
- Павлова Р.П. 1974. Влияние температуры окружающей среды на продолжительность фазы кулолки слепней. Паразитология 8 (3): 243–248. [Pavlova R.P. 1974. On the effect of environmental temperature on the pupal phase duration of gad flies. Parazitologiya 8 (3): 243–248. (in Russian)] https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/1974/prz_1974_3_12_Pavlova.pdf
- Скуфьин К.В. 1973. Методы сбора и изучения слепней. Л., Наука, 104 с. [Skuf'in K. V. 1973. Methods of collecting and studying horseflies, Leningrad, Nauka, 104 p.]
- Cameron A.E. 1926. Bionomics of the Tabanidae (Diptera) of Canadian prairie. Bulletin of Entomological Research 17 (1): 1–42. <https://doi.org/10.1017/S0007485300019039>
- Colinet H., Sinclair B.J., Vernon P., Renault D., 2015. Insects in fluctuating thermal environments. Annual Review of Entomology 60: 123–140. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021017>
- Eisen L., Monaghan A.J., Lozano-Fuentes S., Steinhoff D.F., Hayden M.H., Bieringer P.E. 2014. The impact of temperature on the bionomics of *Aedes (Stegomyia) aegypti*, with special reference to the cool geographic range margins. Journal of Medical Entomology 51 (3): 496–516. <https://doi.org/10.1603/ME13214>
- Huffaker C.B. 1944. The temperature relation of the immature stages of the malarial mosquito, *Anopheles quadrimaculatus* Say, with a comparison of the developmental power of constant and variable temperatures in insect metabolism. Annals of the Entomological Society of America 37 (1): 1–27. <https://doi.org/10.1093/aesa/37.1.1>
- Ludwig D., Cable R. 1934. The effect of alternating temperatures on the pupal development of *Drosophila melanogaster* Meigen. Physiological and Biochemical Zoology 6 (4): 493–508. <https://doi.org/10.1086/physzool.6.4.30151203>
- Majo M.S. De, Zanotti G., Campos R.E., Fischer S., 2019. Effects of constant and fluctuating low temperatures on the development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from a temperate region. Journal of Medical Entomology 56 (6): 1661–1668. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz087>
- Ratte H.T. 1985. Temperature and insect development. In: Hoffmann K.H. (ed.). Environmental physiology and biochemistry of insects. Berlin, Springer-Verlag, 33–66 pp. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70020-0_2
- Segal B. 1936a. Synopsis of the Tabanidae of New York, their biology and taxonomy. 1. The genus *Chrysops* Meigen. Journal of the New York Entomological Society 44 (1): 51–78. <https://www.jstor.org/stable/25004642>
- Segal B. 1936b. Synopsis of the Tabanidae of New York, their biology and taxonomy. (Concluded). Journal of the New York Entomological Society 44 (2): 125–154. <https://www.jstor.org/stable/25004650>
- Tun-Lin W., Burkot T.R., Kay B.H., 2000. Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. Medical and Veterinary Entomology 14 (1): 31–37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00207.x>

TO THE PECULIARITIES OF THE DEVELOPMENT
OF HORSEFLY PUPAL PHASE (DIPTERA, TABANIDAE) IN NORTHWEST RUSSIA

V. V. Agasoi

Keywords: Tabanidae, horseflies, developmental phase duration, larvae, pupae, habitat

SUMMARY

Peculiarities of the pupal development of horseflies have been experimentally studied in Pskov Province with an example of tabanids. The temperature dependence of the pupal phase duration was investigated. Under stable laboratory conditions, the duration of pupal development of the same species obtained from larvae collected in the year of the investigation was characterized by strong fluctuations. Pupae obtained from larvae that had wintered in laboratory, had demonstrated the minimal degree of fluctuation concerning duration of the development. Reasons of these differences are discussed.

УДК 576.895.121.5: 576.31

**ULTRASTRUCTURE OF THE METACESTODE
APLOPARAKSIS SHIGINI BONDARENKO ET KONTRIMAVICHUS, 2006
(CESTODA: APLOPARAKSIDAE)**

© 2021 N. A. Pospekhova^{a,*}, K. V. Regel^a

^aInstitute of Biological Problems of the North,
Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,
Magadan, 685000 Russia

*e-mail: posna@ibpn.ru

Received 24.10.2020

Received in revised form 16.11.2020

Accepted 19.11.2020

The fine structure of the metacestode *Aploparaksis shigini* Bondarenko et Kontrimavichus, 2006 from the predatory leeches *Erpobdella octoculata* L. from the lakes of the Upper Kolyma River basin was studied for the first time. The cysticercoïd is similar to the floricercus, i.e. has an open cellular exocyst and many processes at its base, however, it is distinguished by a long tail. The exocyst and all its outgrowths (including the caudal process) are covered with long and thick microvilli. Excretory canals of different diameter are noted in the exocyst, near the base of the caudal process. The structure of the endocyst is typical of hymenolepidid metacestodes; the glycocalyx has a characteristic reticular structure.

Keywords: metacestode, ultrastructure, floricercus, exocyst, excretory canals

DOI: 10.31857/S0031184721010063

Cysticercoïds *Aploparaksis shigini* represent one of three species of metacestodes found in the predatory pharyngeal leeches *Erpobdella octoculata* L. from the lakes of the Upper Kolyma basin (Regel, 2016). Small aploparaksid metacestodes were freely located in the fluid of lateral lacunae – the rudiments of the coelom, while the larger hymenolepidids from the genus *Kowalewskius* Yamaguti, 1959 were found in the thickness of the botryoid tissue of leeches (Regel, 2010). Following morphological features of *K. formosus* cysticercoïds were noted: closeness to the modification of cyclocercus and the presence of long, thick microvilli on the tail appendage twining the cyst around (Regel, Pospekhova, 2019).

The structural features of the *A. shigini* metacestodes do not allow attributing them to any of the known modifications. The presence of a bowl-shaped outgrowth of the tail appendage, together with numerous lobes at the base of the endocyst, makes it similar to the floricercus (Bondarenko, Krasnoshchekov, 1978; Bondarenko, Kontrimavichus, 2006). However, the floricercus has a relatively short tail, whereas metacestodes from leech has a long tail, forming a single conglomerate with the caudal processes of other metacestodes (Regel, 2016). Similar structure of the caudal process was noted in metacestodes of the

“marine” species of aploparaksids, *Wardium cirrosa* (Krabbe, 1869) (Greben et al., 2019). The authors could not attribute that metacestode to any of the known modifications as well.

The aim of our research is to identify the characteristic features of the fine morphology of the cysticeroid *A. shigini*, which could be useful for specifying of the classification system of metacestodes, as well as for establishing the generic relations with other representatives of the family.

MATERIAL AND METHODS

The original material was obtained by dissection of leeches *Erpobdella octoculata* L. from the lakes of the Upper Kolyma basin. Metacestodes were fixed in a 2% glutaraldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) at a temperature of about 4 °C. After fixation the material was postfixed in a 2 % OsO₄ solution in a 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2) for 12 hours, dehydrated, and embedded in an EPON-araldite mixture. During dehydration, the specimens were stained with a saturated uranyl acetate solution in 70 % ethanol for a night. Ultra-thin sections (90 nm), obtained on an LKB ultratome (Sweden), were viewed in JEM-1011 (JEOL, Japan) operating at 80 kV and JEM-1400Plus (JEOL, Japan) operating at 120 kV transmission electron microscopes.

RESULTS

The location of the exocyst and endocyst on the sections is close to that observed in living metacestodes, although preparation for electron microscopic examination leads to a change of the envelopes' form (fig. 1A, 1B). On the sections, the bowl-shaped profile of the exocyst is located around the endocyst, and the long and dense microvilli of the exocyst form a continuous zone around it (fig. 1B, 1C). The width of this zone sometimes exceeds 10 µm. At a distance of up to 2 µm from the tegument surface, the microvilli retain linear outlines (fig. 1C), while the ends of the microvilli bend, forming numerous profiles on the sections along the border periphery, which makes it difficult to measure the length of separate microvilli. The transverse sections of the microvilli allow watching the fine fibers that bind them into a single border.

Long (up to 100 µm) radial rays, discernible at the surface of the exocyst of some living metacestodes, can be microvilli that shrivel up when processing the material and turn into this border.

The exocyst tegument, containing microvilli, has a thin distal cytoplasm connected with the underlying cytons. They are distinguished by dense cytoplasm and looser karyoplasm with the large amount of heterochromatin (fig. 1C). The tegument of the inner surface of the exocyst, at the base of the endocyst, secretes dense material. The latter is accumulated in the surface cytoplasm, and rounded or oblong bodies are separated from it (fig. 1D, 1E).

Muscle cells with expanded channels of the granular endoplasmic reticulum were not found, although muscle fibers of a small section were noted in the subtegument.

Excretory canals of different diameters are located in the area adjacent to the base of the tail. It was not possible to trace the exact topography of the canals, however, larger canals are located at the base of the bowl-shaped outgrowth of the exocyst; small canals are located outside of large ones. The canal walls are formed by thin syncytium lined with typical round microvilli. In the lumen of the canals, dense bodies and myelin figures are occasionally observed (fig. 1E).

In the contact places of exocyst microvilli and the endocyst glycocalyx, the latter adheres to the microvilli and separates from the endocyst, leaving only an inner homogeneous glycocalyx layer on its surface (fig. 1F).

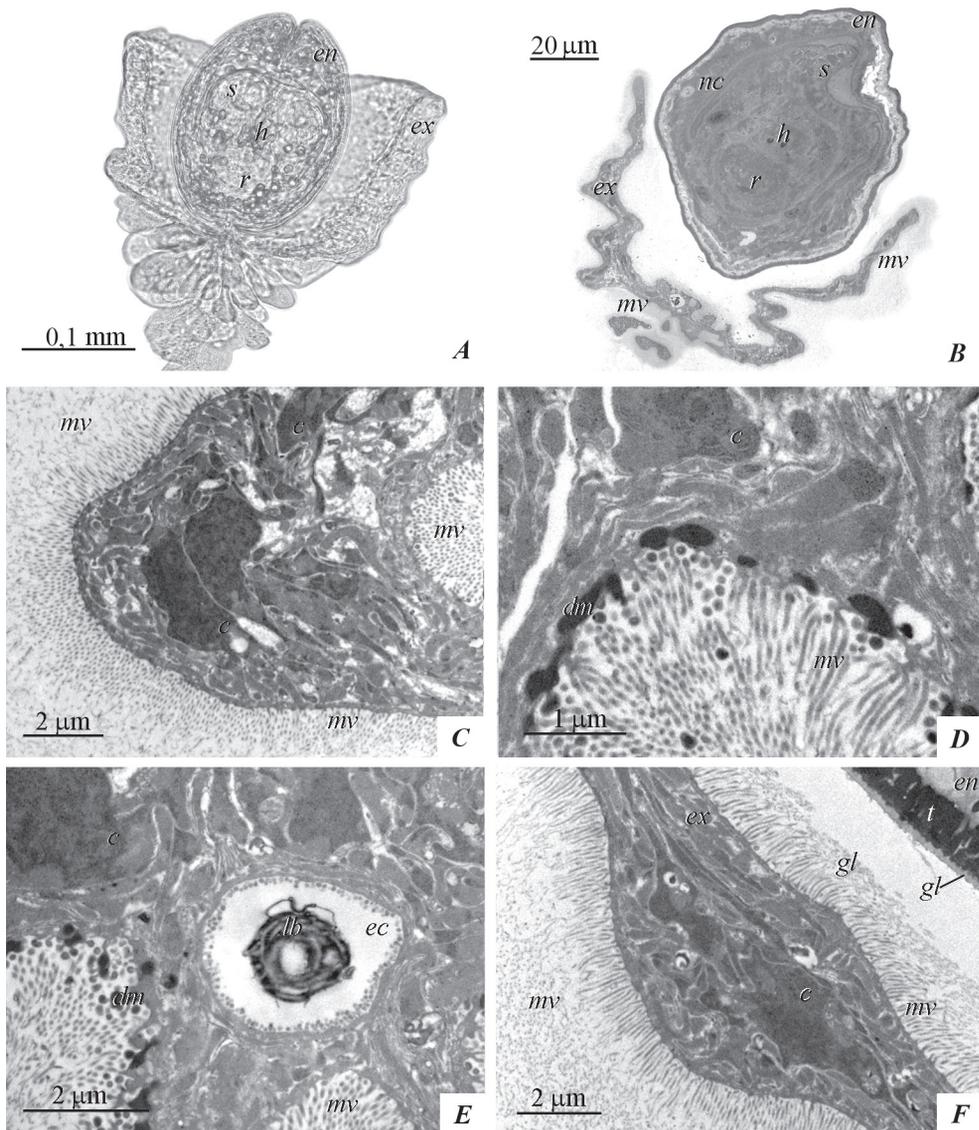


Figure 1. Metacystode of *Aploparaksis shigini*: exocyst.

A – living metacystode,

B – a thin section of the metacystode (tail process is outside the field of view),

C – microvilli of the exocyst tegument,

D – secretion of dense material from the inner surface of the exocyst,

E – excretory canal with a lamellar body,

F – adhesion of endocyst glycocalyx and exocyst microvilli. Abbreviations: *c* – cyton, *dm* – dense material, *ec* – excretory canal, *en* – endocyst, *ex* – exocyst, *gl* – glycocalyx, *h* – rostellar hook, *lb* – lamellar body, *mv* – microvilli, *nc* – neck, *r* – rostellum, *s* – sucker, *t* – distal cytoplasm of tegument.

The endocyst wall structure of *A. shigini* is shown in figs. 2A–2C. The endocyst tegument is covered with a tubular-fibrous glycocalyx up to 6–7 μm thick; its inner layer consists of a homogeneous material of about 200 nm thick (fig. 2B). The tubules form a reticular structure, interspersed with fine fibers and vesicles; there is usually a narrow light zone in the area of attachment of the outer part of the glycocalyx to the inner homogeneous layer (fig. 2A, 2B). The distal cytoplasm of the endocyst, about 1.5 μm thick, is filled with dense material with small cavities (fig. 2A–2C). Fibrous-muscular layers are located under the basal plate: external circular one (with the inclusion of muscle fibers of the same orientation) and internal longitudinal one with longitudinal muscle fibers. The deeper layer of cellular elements (muscle cells, excretory canals and cells whose processes form the pseudomyelin layer at the endocyst border) usually constitutes about $\frac{1}{4}$ of the endocyst wall, in rare cases – up to half of it (fig. 2C).

Large oval calcareous bodies, up to 8–9 μm in diameter, lie in the parietal part of the neck and at the base of the scolex, under the suckers and rostellar sac (figs 1B, 2F). The neck and scolex are covered with microtriches, which are longer in the area of the suckers. In the tegument of the suckers, non-cilia sensory endings can be distinguished; among the muscles of the suckers, there are cells containing numerous light vesicles, about 100 nm in diameter. The endocyst cavity is filled with flaky material and vesicles. The retracted pyriform rostellum with hooks is surrounded behind by the rostellar sac with cords of cells without visible synthetic activity.

DISCUSSION

For the first time, conglomerates of metacestodes with intertwining caudal processes (“larvophores”) were noted in the caudate diplocysts *Wardium fryei* Mayhew, 1925; the author suggested the possibility of asexual proliferation of metacestodes from bud-like outgrowths on the tail appendage (Bondarenko, 1997). The presence of long intertwined caudal processes with rounded thickenings was noted in *A. shigini* by Regel (2016), and subsequently in *W. cirrosa* by Greben et al. (2019), and in the latter case, the authors also suggested the possibility of the development of several cysticeroids from one oncosphere.

No evidence of asexual reproduction of *A. shigini* by budding was found in our material, although we do not exclude this possibility. The cellular exocyst of *A. shigini*, together with all its processes, is a modified tail appendage (cercomer according to Freeman, 1973; Gulyaev, 1989; Chervy, 2002; Greben et al., 2019 and other authors). In some cyclophyllids, it is the homologues of the tail appendage that contain poorly differentiated cells capable of forming new individuals, as noted, for example, in the multicercus *Mircia shigini* (Gulyaev et Konyaev, 2006) (Gulyaev, 1989; Regel, Pospekhova, 2012; Pospekhova, Regel, 2015).

The presence of a thick border of long microvilli is characteristic of the tail appendage and its homologue in two examined (by electron microscopy) metacestodes from leeches *E. octoculata* (*K. formosus* and *A. shigini*), although they have different localization (tissue and cavity), belong to different families (Hymenolepididae and Aploparaksidae), are close to different morphological modifications (cyclocercus and florircercus) and parasitize in different definitive hosts (Laridae and Anatidae) (Regel, 2016). The only common feature of these metacestodes is the same intermediate host - the pharyngeal leech *E. octoculata*. Supposedly, long dense microvilli, which are a kind of frame for the glycocalyx of the tail appendage tegument, is a general adaptation of various modifications of cyclophyllids metacestodes in the body of pharyngeal leeches.

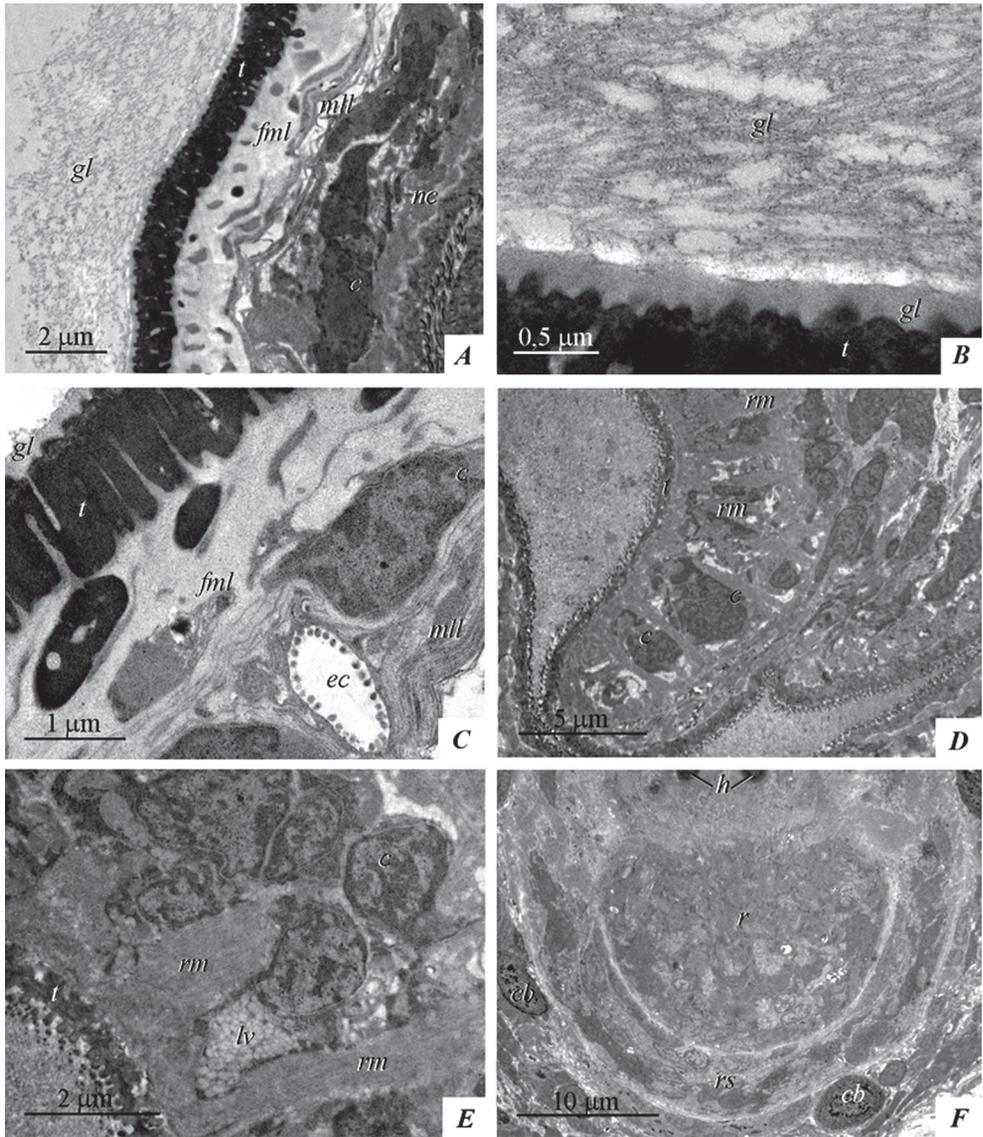


Figure 2. Metacystode of *Aploparaksis shigini*: endocyst and definitive part.

A – endocyst and parietal part of the neck,

B – endocyst glycocalyx,

C – endocyst wall,

D – sucker,

E – a cell with light vesicles in a sucker,

F – rostellum and rostellar sac.

Abbreviations: *c* – cyton, *cb* – calcereous body, *ec* – excretory canal, *en* – endocyst, *fml* – fibrous–muscular layer, *gl* – glycocalyx, *h* – rostellar hook, *lb* – lamellar body, *lv* – light vesicles, *mll* – myelin-like layer, *nc* – neck, *r* – rostellum, *rm* – radial muscles, *rs* – rostellar sac, *s* – sucker, *t* – distal cytoplasm of tegument.

A possible protective role of exocyst long microvilli has been noted for a typical diplocyst *Aploparaksis bulbocirrus* Deblock et Rausch, 1968: in the area of the exocyst outlet, the microvilli are denser and longer, comparing to those, on the lateral surface. They intertwine and form a “plug” (Nikishin, 2009). It is possible that this “plug” prevents the penetration of host immune cells into the exocyst cavity.

Studying the postembryonic development of aploparaksids at the light-microscopic level, the presence of excretory canals and cyrtocytes in the cellular exocyst of *A. birulai* floriferus, typical diplocysts *A. scolopacis*, and caudate diplocysts *W. friey* was noted (Bondarenko, Krasnoshchekov, 1978; Bondarenko, 1993, 1997). Our finding of excretory canals in the exocyst of *A. shigini* and the absence of similar data in ultrastructural studies of other cysticercoids of the Aploparaksidae family (Nikishin, Krasnoshchekov, 1979; Nikishin, 2009) may indicate only local functioning period the of the exocyst excretory system in postembryonic development, or be associated with specific structural features of a particular type of cestodes in the intermediate host.

The endocyst walls of the studied species have the same morphological features that are noted for the endocysts of hymenolepidids: the distal cytoplasm of the tegument is filled with dense material, the muscle fibers of the subtegumental muscles are embedded into fibrous layers of the same orientation, the wall of the endocyst is separated from the parietal part of the neck by the so-called pseudomyelin (myelin-like) layer (Caley, 1974). However, the endocyst glycocalyx of *A. shigini* is quite different from those previously described (see review by Nikishin, 2017). It also differs from the glycocalyx of another species of metacestodes from leeches, *K. formosus* (Regel, Pospekhova, 2019). In the latter case, the endocyst glycocalyx has a fibrous structure typical of hymenolepidids, which is denser near the tegument surface.

Analysis of the available literature and our observations show that the main role in the formation of metacestodes morphological polymorphism belongs to temporary larval structures, which undergo significant changes during the postembryonic development. This is especially evident in metacestodes of the Aploparaksidae family. Such features, as the degree of immersion of the endocyst into the exocyst, the shape of the exocyst, and the length of the tail process can vary depending on the stage of development, the intensity of invasion, and many other factors, which are still unknown.

An even more significant (in our opinion) difference in the postembryonic development of some aploparaksids is the presence of two invaginations (most cyclophyllids have only one), as well as the displacement of the primary lacuna into the tail appendage primordium (Gulyaev, 1977; Bondarenko, 1978; Bondarenko, Kontrimavichus, 2006; Nikishin, 2009; Pospekhova, 2017).

Considering these circumstances, as well as a significant prevalence of molecular genetic research methods in modern helminthology, the study of life cycles (Blasco-Costa, Poulin, 2017) and the morphological characteristics of various modifications of metacestodes is of particular importance, since it is obvious that to obtain a complete picture “... it is necessary to study all existing modifications of cestodes’ larvae” (Mrazek, 1927).

ACKNOWLEDGEMENTS

The research was carried out in the course of fulfilling the state assignment on the project “Taxonomic, morphological and ecological diversity of helminths of vertebrates in North Asia” No. AAA-A17-117012710031-6. The authors are grateful to the respected reviewers for constructive and friendly reviews.

REFERENCES

- Blasco-Costa I., Poulin R. 2017. Parasite life-cycle studies: a plea to resurrect an old parasitological tradition. *Journal of Helminthology* 91 (6): 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0022149X16000924>
- Bondarenko S.K. 1978. Postembryonal development of cestodes of the genus *Aploparaksis* Clerc, 1903 (Hymenolepididae) with a cysticeroid of the diplocyst type. *Parazitologiya* 12 (4): 345–348 [In Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/1978/prz_1978_4_11_Bondarenko.pdf
- Bondarenko S.K. 1993. *Aploparaksis scolopacis* and some questions of its ecology. *Parazitologiya* 27 (3): 251–259. [In Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/1993/prz_1993_3_6_Bondarenko.pdf
- Bondarenko S.K. 1997. The life cycle of the *Wardium fryei* (Cestoda: Hymenolepididae). *Parazitologiya* 31 (2): 142–156 [In Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/1997/prz_1997_2_6_Bondarenko.pdf
- Bondarenko S.K., Kontrimavichus V.L. 1976. Polymorphism of the larvae of the genus *Aploparaksis* Clerc, 1903 (Hymenolepididae). *Folia Parasitologica* 23 (1): 39–44. <https://folia.paru.cas.cz/pdfs/fo/1976/01/05.pdf>
- Bondarenko S.K., Kontrimavichus V.L. 2006. Aplaparaksidae of wild and domesticated birds. *Fundamental of Cestodology*. T.14. Moscow, Nauka, 443 p. [In Russian].
- Bondarenko S.K., Krasnoshchekov G.P. 1978. Postembryonic development of the cestode *Aploparaksis birulai* (Hymenolepididae). *Zoologicheskyy Zhurnal* 57 (4): 485–494. [In Russian].
- Caley J. 1974. The functional significance of scolex retraction and subsequent cyst formation in the cysticeroid larva of *Hymenolepis microstoma*. *Parasitology* 68 (2): 207–227. <https://doi.org/10.1017/S0031182000045741>
- Chervy L. 2002. The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Systematic Parasitology* 52 (1): 1–33. <https://doi.org/10.1023/A:1015086301717>
- Freeman R.S. 1973. Ontogeny of cestodes and its bearing on their phylogeny and systematics. *Advances in Parasitology* 11: 481–557. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60191-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60191-8)
- Greben O., Kudlai O., Korniyushin V.V. 2019. The intermediate hosts of *Wardium cirrosa* (Krabbe, 1869) Spassky, 1961 (Cestoda, Cyclophyllidae, Aploparaksidae) in Ukraine. *Parasitology Research* 118: 3129–3137. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06453-0>
- Gulyaev V.D. 1977. Larvogenesis of diplocyst of *Aploparaksis furcigera* (Rud., 1819) Fuhrmann, 1926 (Cestoda, Hymenolepididae). *Parazitologiya* 11 (1): 17–22 [In Russian]. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/1977/prz_1977_1_3_Gulyaev.pdf
- Gulyaev V.D. 1989. New morpho-ecological types of the cysticeroids of cestodes of subfamily Schistotaeniinae Johry, 1959. *Ekologiya gelmintov pozvonochnykh Sibiri*. Novosibirsk, Nauka, Sibirskoe Otdelenie, 199–213 [In Russian].
- Mrázek A. 1927. Organisaace a ontogenie larvy druhu *Tatria acanthorhyncha* (Wedl.). *Věstník Kralovské České Společnosti Nauk* 7: 1–12 [In Czech].
- Nikishin V.P. 2009. Structure and differentiation of the tissues of cysticeroids. 2. Differentiation of the exocyst in typical diplocyst *Aploparaksis bulbocirrus* (Cestoda, Hymenolepididae). *Invertebrate Zoology* 6 (2): 129–145 [In Russian]. https://kmljournals.com/upload/PDF/IZ/IZ%20Vol%2006/invert6_2%20129_145%20Nikishin.pdf
- Nikishin V.P. 2017. Morphofunctional diversity of glycocalyx in tapeworms. *Biology Bulletin Reviews* 7 (2): 160–178. <https://doi.org/10.1134/S2079086417020050>
- Nikishin V.P., Krasnoshchekov G.P. 1979. Ultrastructural organization of the cercomere of *Aploparaxis polystrictae* Schiller, 1955 and *Aploparaksis furcigera* (Rudolphi, 1819) diplocysts. In: Sonin M.D. (ed.). *Oecology and morphology of the vertebrates' helminthes in Chukotka*. Moskva, Nauka, 133–138 [In Russian].
- Pospekhova N.A. 2017. Location of the primary lacuna in the postembryonic development of selected Cyclophyllidae (Cestoda): a review. *Invertebrate Zoology* 14 (2): 167–173. doi: 10.15298/invertzool.14.2.11
- Pospekhova N.A., Regel K.V. 2015. Morphology and ultrastructure of two schistotaeniid cysticeroids (Cestoda: Cyclophyllidae) from the haemocoel of the dragonfly larvae. *Parazitologiya* 49 (5): 339–351. https://www.zin.ru/journals/parazitologiya/content/2015/prz_2015_5_2_Pospekhova.pdf
- Regel K.V. 2010. Leeches *Erpobdella octoculata* L. - intermediate hosts of *Kowalewskius parvula* (Kowalewski, 1904) and *Kowalewskius formosa* (Dubinina, 1953) comb. nov. in the Kolyma basin. *International Symposium "Parasites of the Holarctic Region"*, Petrozavodsk, 4–8 October 2010, 70–73 [In Russian].
- Regel K.V. 2016. On taxonomic position of aploparaksid' metacestodes found in leeches *Erpobdella octoculata* in the Upper Kolyma river basin. *Transactions of Center of Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS* 49: 121–123 [In Russian].
- Regel K.V., Pospekhova N.A. 2012. Biodiversity and morphological features of metacestodes – dragonflies larvae' parasites of the North-East Asia. *Bulletin of the NESCFEB RAS*. 4: 75–83 [In Russian].
- Regel K.V., Pospekhova N.A. 2019. On the morphology of metacestodes of the genus *Kowalewskius* – parasites of the leeches *Erpobdella octoculata* from the Kolyma river basin. *Parazitologiya* 53 (2): 91–104 [In Russian] DOI: 10.1134/S0031184719020017

УЛЬТРАСТРУКТУРА МЕТАЦЕСТОДЫ
APLOPARAKSIS SHIGINI BONDARENKO ET KONTRIMAVICHUS, 2006
(CESTODA: APLOPARAKSIDAE)

Н. А. Поспехова, К. В. Регель

Ключевые слова: метацестода, ультраструктура, экзоциста, флорицерк

РЕЗЮМЕ

Впервые изучено тонкое строение метацестоды *Aploparaksis shigini* Bondarenko et Kontrimavichus, 2006 от плоточных пиявок *Erpobdella octoculata* L. из озёр бассейна Верхней Колымы. Цистицеркоид схож с флорицерком, т.е. имеет незамкнутую клеточную экзоцисту и множество отростков у её основания, однако отличается длинным хвостом. Экзоциста и все её выросты (включая хвостовой отросток) покрыты длинными, густыми микроворсинками. Экскреторные каналы разного диаметра отмечены в экзоцисте, вблизи основания хвостового отростка. Структура эндоцисты типична для гименолепидидных метацестод, гликокаликс имеет характерное сетчатое строение.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Общая информация

Журнал «Паразитология» — первый и ведущий специализированный научный журнал паразитологической тематики на русском языке. В данный момент публикуются статьи в двух языках – русском и английском. Выходит 6 выпусков журнала в год; все статьи проходят рецензирование.

Журнал «Паразитология» основан в 1967 году по инициативе академика Б.Е. Быховского в Зоологическом институте; учредителем выступила Академия наук СССР. С момента основания в журнале публикуются научные статьи, прошедшие процесс рецензирования; также освещаются недавно вышедшие книги и новости науки. Тематическую основу журнала традиционно составляли статьи по паразитическим червям, протистам и клещам; всегда приветствовались работы, выполненные современными методами. Сейчас журнал публикует статьи разнообразной тематики, сохраняет локальную специфику, но фокусируется на исследованиях, имеющих глобальное значение.

Цель журнала «Паразитология» – способствовать развитию паразитологических исследований в России и в мире за счёт предоставления эффективной, качественной и современной платформы для коммуникации исследователей.

Тематику журнала составляет широкий спектр вопросов современной паразитологии, включая узкие прикладные аспекты медицины и ветеринарии.

- Биологическое разнообразие, распространение и систематика. Описания новых видов могут быть опубликованы, если они включают какую-то дополнительную обобщающую информацию.
- Широкий спектр объектов: любые паразитические Metazoa, грибы и протисты; а также бактерии и вирусы – в случае, если работа имеет общепаразитологический характер.
- Морфологические исследования, расширяющие наши представления об устройстве и функционировании паразитических организмов.
- Экологическая паразитология, жизненные циклы и пути трансмиссии паразитов, филогеография.
- Функционирование паразитарных систем, особенности паразито-хозяинных отношений.
- Вопросы эволюции, коэволюции и филогении.
- Общие и фундаментальные вопросы паразитологии.
- Природно-очаговые трансмиссивные заболевания (с паразитологическим, а не медицинским или ветеринарным акцентом).

Как отправить рукопись

- Рукописи статей и дополнительные файлы отправлять на адрес редакции: parazitologiya@zin.ru; если объем рукописи вместе с рисунками превышает 15 Мб, рекомендуется отправлять ее несколькими сообщениями или воспользоваться файлообменным сервисом
- В сопроводительном письме авторы должны предложить 2–4 возможных рецензента, а также могут указать нежелательных.
- Редакция оставляет за собой право сокращать тексты рукописей и вносить в них редакционные изменения. При исправлении автором статьи после рецензирования исправленный электронный вариант статьи должен быть возвращен в Редакцию не позднее оговоренного редактором срока, максимум – 2 месяца. В противном случае статья рассматривается как вновь поступившая.

После того, как статья принята к печати, необходимо выслать договор о передаче авторского права, подписанный всеми авторами.

Типы принимаемых рукописей

В журнале публикуются исследовательские статьи и краткие сообщения; обзорные и дискуссионные статьи; сообщения о новых методах исследования; рецензии на книги, опубликованные в текущем году, хроника. Предварительные сообщения, статьи узко-медицинской и узко-ветеринарной направленности, статьи по философии и методологии паразитологии не принимаются. Сообщения о научных собраниях (съездах, конференциях, симпозиумах и т. д.),

предназначенные для публикации в разделе «Хроника», принимаются редакцией, если они поступают не позднее чем через 2 месяца после того, как состоялись собрания.

Номенклатурные требования

Авторы должны строго придерживаться Международного кодекса зоологической номенклатуры в его последнем издании

(<https://www.iczn.org/the-code/the-international-code-of-zoological-nomenclature/>). Каждое первое упоминание названия таксона видового и родового рангов в аннотации и, еще раз, в основном тексте статьи должно сопровождаться указанием автора таксона, а название таксона паразита – также указанием года его описания. Авторы и годы описания видов

и подвидов должны заключаться в скобки, если вид (подвид) первоначально был описан в другом роде и лишь позднее перенесен в род, характеризующий современное название вида. Название рода в составе биномена сокращается до первой буквы при втором и последующих упоминаниях, например: *Fasciola hepatica* (L., 1758) и *F. hepatica*, за исключением тех случаев, когда с него начинается предложение, или когда сокращение может быть неправильно понято, а также в подписях к рисункам.

Описание новых таксонов

- Обозначения статуса названий: gen. n., sp. n., gen. et sp. n., comb. n., stat. n.
- Рекомендованная рубрикация: Род (подрод): Название, Типовой вид, Диагноз, Сравнение и замечания, Этимология.
- В случае описания новых таксонов видового и подвидового рангов:
 - Вид (подвид): Название.
 - Материал (голотип и парагипы, или синтипы, или гапанотипы) с указанием числа типовых особей, пола, стадии развития, касты, размеров, способа консервации или типа препарата, места хранения и инвентарных номеров.
 - Местонахождение: ГИС (координаты точек для типового местонахождения и всех точек иных местонахождений нового вида в одном из форматов Google Maps), географические названия от крупных единиц к мелким), даты сбора, фамилии и.о. сборщиков.
 - Описание, включая изменчивость признаков, дифференциальный диагноз, данные по паразито-хозяйным отношениям и жизненному циклу (если имеются).
 - Хозяин (или прокормитель, кормовое растение) для типового материала и иных находок нового вида.
 - Этимология.
- В качестве учреждений для хранения типовых материалов в России наиболее предпочтительны Зоологический Институт РАН (Санкт-Петербург), Зоологический Музей МГУ (Москва) и Центр паразитологии ИПЭЭ РАН (Москва).
- Рекомендуется регистрировать описания новых таксонов в <http://zoobank.org/>.

Структура текста

УДК XXX.XX/XXX

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

© 2021 г. А. А. Автор ^{a,*}, А. А. Автор ^b, А. А. Автор ^{a,b}

^a Название организации, ул. Улица, номер дома, Город, почтовый индекс Страна

^b Название организации, ул. Улица, номер дома, Город, почтовый индекс Страна

* e-mail: адрес автора, с которым следует вести переписку

Поступила в редакцию (заполняется редакцией)

После доработки (заполняется редакцией)

Принята к печати (заполняется редакцией)

Краткая аннотация (в среднем 10–15 строк). Аннотация статьи должна быть информативной и должна описывать материал, методы и главные результаты исследования. Аннотация не должна содержать ссылок на источники литературы.

Ключевые слова: 3–6 слов или коротких словосочетаний, должны точно отражать содержание статьи

Введение (без заголовка), содержащее постановку вопроса и краткий обзор литературных данных. Должно содержать краткую характеристику состояния проблемы и обоснование цели излагаемой работы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Подзаголовок 1

Если текст раздела требует дальнейшей рубрикации, он может включать подзаголовки, но не менее двух.

Раздел должен содержать подробную характеристику материала (место сбора, способ фиксации и т. п.) и методов анализа. При использовании молекулярно-генетических методов необходимо указывать протокол обработки проб, праймеры и программы, с помощью которых проводился анализ. При всех видах исследований указываются марки приборов, на которых они выполнены.

Количественный материал должен быть обработан адекватными статистическими методами. Необходимо приводить информацию о повторности наблюдений, измерений и пр. Важно указывать компьютерные программы, использованные при статистической обработке данных, а также стандартные методики и тестовые процедуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Подзаголовок 1

Если текст раздела требует дальнейшей рубрикации, он может включать подзаголовки, но не менее двух.

Текст результатов включает описание оригинальных наблюдений, опытов, таксономические описания. Если в тексте упоминаются таблицы (табл. 1), то на полях (слева) указываются места их расположения (после первого упоминания в тексте). Если в тексте упоминаются рисунки (рис. 1; рис. 1*F*), места их расположения в тексте (после первого упоминания) отмечаются так же, как для таблиц. Если статья имеет единственную таблицу или единственный рисунок, то ссылки выглядят так: Табл. 1 и Рис. 1.

В разделе «Результаты» не должно быть ссылок на литературные источники, а только изложение результатов самого исследования. При изложении результатов следует избегать их анализа. Первичные результаты количественных исследований по возможности должны быть отражены в таблицах и диаграммах. Большие массивы данных следует представлять в компактном виде после статистической обработки. Текст не должен дублировать содержание таблиц и иллюстраций.

ОБСУЖДЕНИЕ

Подзаголовок 1

Если текст раздела требует дальнейшей рубрикации, он может включать подзаголовки, но не менее двух.

В разделе «Обсуждение» не следует повторять данные вводной части статьи и какие-либо результаты исследования, не изложенные в предыдущем разделе «Результаты», поскольку смысл раздела «Обсуждение» – анализ и сравнение вновь полученных результатов с ранее опубликованными данными других исследований.

Обсуждение результатов следует выдерживать в рамках результатов данной статьи, не переходя к чрезмерным обобщениям. Приведение в обсуждении данных, выводов и концепций других авторов должно обязательно сопровождаться необходимыми литературными ссылками, а прямое цитирование – кавычками и ссылкой. Обсуждение должно завершаться кратким заключением или основным выводом.

Разделы «Результаты» и раздел «Обсуждение» в кратких сообщениях (до 10 стр.) могут быть объединены в один раздел.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заключение и/или выводы могут быть вынесены в отдельный раздел рукописи после раздела «Обсуждение».

БЛАГОДАРНОСТИ

В этой рубрике обязательно указываются все источники финансирования проектов: номера государственных заданий и грантов, за счет которых проводились исследования; а также выражается признательность частным лицам, сотрудникам учреждений и фондам, оказавшим содействие в проведении исследований и подготовке статьи. Имя сотрудника учреждения, которому выражается благодарность, сопровождается названием этого учреждения, города и страны, в которых оно находится, имя частного лица – названием места и страны проживания. Сперва указываются благодарности частным лицам, затем – организациям и фондам.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ (с новой страницы)
РЕЗЮМЕ СТАТЬИ НА АНГЛИЙСКОМ ЯЗЫКЕ (с новой страницы)
с переводом на русский язык

Должно иметь объем не более 1.5 страниц и должно быть составлено по следующему плану:

1) название статьи, максимально точно соответствующее русскому названию, 2) инициалы и фамилии авторов в английской транслитерации, 3) ключевые слова, 4) заголовок – SUMMARY, 5) собственно текст резюме, 6) русский перевод текста резюме. Если английское резюме является переводом аннотации к статье, оно все равно должно сопровождаться точным русским переводом. Английский текст должен быть написан с соблюдением норм грамматики (переводы, сделанные с помощью компьютерных программ, недопустимы). Рекомендуется особое внимание обратить на перевод специальных терминов: он должен соответствовать терминам, принятым в англоязычной литературе по данной области знания, и не должен быть буквальным переводом по словарю общей лексики; исключение может быть сделано только для оригинальной терминологии.

1. Таблицы (каждая с новой страницы); слева на полях указать местоположение каждой таблицы после первого упоминания в тексте (см. шаблон)

2. Подписи к рисункам (с новой страницы); слева на полях указать местоположение каждого рисунка после первого упоминания в тексте (см. шаблон).

3. Теоретические и обзорные статьи могут иметь произвольную структуру (резюме на английском языке обязательно).

Статья на английском языке

В англоязычной рукописи после названия статьи, имен авторов, мест работы авторов, аннотации и ключевых слов дается их перевод на русский язык (каждый раздел с новой строки). Подписи к рисункам и заголовки таблиц даются только на английском языке, отдельное резюме в конце статьи не требуется. В списке литературы ссылки на работы, написанные на языках, не использующих латиницу (в т.ч. на русском), пишутся в английском переводе, при этом в конце ссылки, в квадратных скобках, указывается язык: [In Russian], [In Japanese] и т.п. Желательно, чтобы англоязычные рукописи были проверены носителем языка (биологом), с соответствующей ссылкой в разделе “Acknowledgements”. Рукописи, не соответствующие нормам грамматики и стилистики английского научного языка, отклоняются.

Форматирование файла

- формат .doc (не .docx) или .rtf
- поля 3 см с левой стороны, 1.5 см справа, 2.5 см сверху и 2 см снизу
- шрифт Times New Roman, 12 pt, через 2 интервала
- выравнивание по левому краю, отступ первых строк абзацев на 1.25 см
- нумерация страниц рукописи – с 1-й страницы, сверху справа
- сквозная нумерация строк
- подстрочные примечания должны иметь сплошную нумерацию по всей статье
- объём рукописи до 25 страниц текста в формате A4 (включая таблицы и список цитируемой литературы)

Рекомендуется, чтобы объем иллюстраций не превышал одной трети объема рукописи. Объем обзорных и теоретических статей следует согласовывать с редакцией.

Оформление текста

- без переноса слов
- без полужирного, разреженного и т.п. шрифтов в основном тексте
- подзаголовки выделяются полужирным шрифтом
- курсивом выделяются только названия таксонов родового и более низкого ранга
- заголовки выделяются с помощью одной пустой строки до и одной после заголовка

Пунктуация

Тире и дефис

- «Среднее тире» (en dash, –): (1) выделенное пробелами, в качестве тире как знака пунктуации в предложениях; (2) без пробелов, для обозначения интервалов величин (например: 21–35 мм); (3) без пробела, в качестве знака «минус» (–7 °C).

- «Длинное тире» (em dash,—) использовать не следует.
- Дефис (-) используется для разделения частей слова.

Пробелы

- Инициалы пишутся с пробелом только в заголовке для авторов статьи (А. В. Иванов) и в английском резюме (A. V. Ivanov). В тексте и в списке литературы между инициалами нет пробела.
- При указании значения физической величины и относительного количества необходимо оставлять пробел между числом и обозначением единиц величины, например: 5 °С, 8 %.
- Знаки количественных отношений (>, <, ≥, =), операций сложения и вычитания (+, −) и знак разброса значений (±) выделяются пробелами (2 + 2 = 4; 35.99 ± 4.13).
- Знаки умножения и возведения в степень пробелами не выделяются (4×2 = 23).
- Числа с буквами в обозначениях набирают без пробелов: (IVd; 1.3.14a; рис. 1д).
- Ссылки на рисунки и таблицы набираются с пробелами (рис. 1, табл. 2 вместо рис.1, табл.2).
- Между знаком номера (или параграфа) и числом ставится пробел: № 1; § 5.65.

Географические координаты

- При записи координат в градусах, минутах и секундах должны использоваться специальные символы Microsoft Word (°, ', ").
- Следует использовать только те форматы, с помощью которых можно немедленно найти нужную точку на электронной карте, например, в Google Maps: 55°50'11.7 N 71°42'07.0 W или 55.836593, -71.701933

Прочее

- Десятичный разделитель – точка.
- Формат даты: 06.05.2019.
- Кавычки для слов на кириллице – «елочки»; для слов на латинице – левые и правые верхние кавычки (“cluster analysis”).

Сокращения

- Все сокращения должны быть расшифрованы, за исключением небольшого числа общепотребительных (например, ПЦР). Сокращения из нескольких слов разделяются пробелами (760 мм рт. ст.; м над ур. м., т. пл.; пр. гр.; «ч. д. а.»; «ос. ч.»), за исключением самых общепотребительных: и т. д.; и т. п.; т. е.
- Сокращенные названия учреждений следует при первом упоминании в тексте сопровождать полными названиями, например: Зоологический институт РАН (ЗИН РАН).
- Рекомендованные сокращения географических терминов: г. – город (но не гора или горы, эти слова следует писать полностью); о-в – остров; оз. – озеро; п-ов – полуостров; пос. – поселок; р. – река; с. – село; хр. – хребт (перед названием хребта; после названия хребта это слово писать полностью).
- Рекомендованные обозначения единиц времени: секунда – с, минута – мин, час – ч, сутки – сут (без точек в конце). С точкой в конце: мес. – месяц, г. – год
- Градус обычно указывают символом, например – 3 °С.
- Точка ставится в случае сокращений (например, т. пл. – температура плавления), но не ставится в случае подстрочных буквенных индексов (Тпл – температура плавления).

Библиографические ссылки

Внутритекстовые ссылки приводятся так: Северцов (1932), ряд авторов (Северцов, 1932; Brown, Smith, 1941), Браун, Смит (Brown, Smith, 1941), (Kryzhanovsky et al., 1995). Если авторов три и более, то указывается фамилия только первого автора и пишется «и др.» или «et al.» Например: (Wen et al., 1984; Шульман и др., 1993). При упоминании в тексте фамилий русских авторов следует писать: «Смирновым и др. (1997) было показано...». При ссылке на публикации иностранных авторов следует избегать написания их фамилий по-русски. Например: «Однако существует другое мнение (O’Connor et al., 1993), согласно которому...» или «Позже Weiss (1955) установил...». То же касается упоминания названий иностранных учебных заведений, фирм, фирменных продуктов и т.д. В ссылках на устное сообщение следует указывать инициалы (без пробела).

При ссылках в скобках на несколько публикаций ссылки располагаются в хронологическом порядке, например: «В ряде работ (Шлугер, 1967; Wrenn, Loomis, 1971; Бочков, Миронов, 1985 и др.) было обнаружено...». При этом если цитируются работы одного и того же года, ссылки

располагаются в алфавитном порядке: сначала русские, потом иностранные. Если цитируется несколько работ одного и того же автора (группы авторов), опубликованных в одном и том же году, то к году добавляются русские или латинские (если статья опубликована на иностранном языке) строчные буквы в алфавитном порядке. Например: (Петров и др., 1995а, б; Smith, 1997а, d; McAloon et al., 1998b). Порядок расстановки букв определяется положением статьи в разделе «Список литературы».

При цитировании в оригинале или переводе работы из правомерно опубликованных источников (в объеме, оправданном целью цитирования), после ссылки на источник необходимо указать страницу, на которой находится цитируемый фрагмент, например: (Cheng, 1986, p. 20). При ссылке на рисунок или таблицу в цитируемой работе следует указать номер рисунка или таблицы, например (Richard, 1963, fig. 3а, p. 11).

Список литературы

Делается выступ первой строки 1.25 см (с фамилиями авторов) для каждого источника. Список литературы не нумеруется. В него помещаются, в алфавитном порядке, сначала работы, опубликованные на русском и других языках, использующих кириллицу, а затем работы, опубликованные на языках с латинским алфавитом. Инициалы авторов пишутся без пробела, но имеется пробел между фамилией автора и инициалами. Таким же образом пишутся инициалы в тексте статьи и таблицах; но в заголовке статьи и в резюме инициалы авторов отделяются друг от друга и от фамилии автора пробелом. Названия источников (журналов, сборников, продолжающихся изданий и др.) не сокращаются. Для облегчения составления списка литературы рекомендуется использовать компьютерные библиографические программы, например EndNote или Mendeley.

Политика в отношении доступности информации о цитировании

Ссылки на работы, опубликованные на японском, китайском и других языках, использующих шрифт, отличный от латиницы и кириллицы, даются только в английском переводе.

В статьях на русском языке ссылки на работы, опубликованные на языках, использующих кириллицу, даются на языке оригинала и далее в квадратных скобках – в переводе на английский язык. Если отсутствует официальный перевод названия статьи и/или названия журнала, следует использовать транслитерацию. Подобные ссылки дополняются пометкой о языке оригинала в круглых скобках (например, (in Russian)) перед закрывающей квадратной скобкой.

В статьях на английском языке список литературы должен содержать только информацию на латинице. В конце ссылки, в квадратных скобках, указывается язык: [In Russian], [In Japanese] и т.п.

В самом конце библиографической ссылки следует помещать цифровой идентификатор объекта (DOI), если он существует

Леонович С.А. 2019. О типах паразитизма иксодовых клещей (Ixodidae). *Паразитология* 53 (5): 416–420. [Leonovich S.A. 2019. Types of parasitism of hard ticks (Ixodidae). *Parazitologiya* 53 (5): 416–420. (in Russian)]. <https://doi.org/10.1134/S0031184719050053>

Статьи в журналах

Фамилии и инициалы авторов, год, название статьи, название журнала, номер тома (отделяется от названия журнала только пробелом), номер выпуска в скобках (не обязательно), первая и последняя страницы статьи, перед которыми ставится двоеточие:

Швецова Л.С. 2004. О составе рода *Copiatestes* Crowcroft, 1948 (Digenea: Syncoeliidae). *Паразитология* 38 (6): 547–551.

Статьи в книгах или сборниках

Фамилии и инициалы авторов, год, название статьи, фамилия главного или ответственного редактора сборника, название книги (сборника), место издания, издательство, номер тома, номер выпуска, если таковые имеются, первая и последняя страницы статьи, перед которыми ставится запятая:

Филиппова Н.А. 1985. Особенности таежного клеща как политипического вида. В кн.: Филиппова Н.А. (ред.). *Таежный клещ Ixodes persulcatus* Schulze. Л., Наука, 184–185.

Witte H. 1991. The phylogenetic relationships within the Parasitengonae. In: Dusbábek F., Bukva V. (eds). *Modern acarology*. Prague, Academia, Vol. 2, 171–182.

Книги

Фамилии и инициалы авторов, год издания, название книги, место издания, издательство, число страниц:

Васюкова Т.Т., Миронов С.В. 1991. Перьевые клещи гусеобразных и ржанкообразных Якутии. Новосибирск, Наука, 201 с.

Книги, переведённые на русский язык

Ссылки должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных:

Майр Э. 1974. Популяции, виды и эволюция. Пер. с англ. М., Мир, 460 с. (Mayr E. 1970. Populations, species, and evolution. Cambridge, Harvard University Press, 453 pp.).

Книги, изданные в составе серий

Дополнительно указываются номер тома и выпуска. Обозначения тома и выпуска приводятся, как в оригинале, например: Vol. 1, № 5 (английский); T. 2, fasc. 4 (французский), Bd. 3, Hf. 1 (немецкий):

Штакельберг А.А. 1937. Семейство Culicidae. Кровососущие комары (Culicinae). Фауна СССР. Двукрылые. М., Л., Изд-во АН СССР, т. 3, вып. 4, 260 с.

Тезисы доклада

Matthee S., Morand S., Stekolnikov A. 2017. Trombiculids parasitising rodents: their diversity and distribution on and off the host. 3rd International Congress on parasites of wildlife, Kruger National Park, South Africa, 24–27 September 2017, 31.

Депонированная научная работа

Болотин Е.И. 1980. Эколого-фаунистический обзор иксодовых клещей Приморского края. Владивосток, Деп. в ВИ НИТИ 22.04.80, № 1906.

Авторефераты диссертаций

Петерсон А.М. 2001. Слепни (Diptera, Tabanidae) Нижнего Поволжья. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 27 с.

Сетевые ресурсы:

Suzuki R., Shimodaira H. 2011. Package “pvclust”. Hierarchical clustering with p-values via multiscale bootstrap resampling. Ver 1.2-2. Режим доступа: <http://cran.r-project.org/web/packages/pvclust/index.html> (18 февраля 2013)

Таблицы

- Количественные данные, используемые для сравнительного анализа, должны быть статистически обработаны (ошибка среднего, доверительный интервал, достоверность, объем выборки и т. п.).
- Каждая таблица должна размещаться на отдельном листе или листах, иметь свой номер, который указывается при ссылке на таблицу в тексте (например: табл. 1), и заголовок. На втором и последующих листах дается верхний колонтитул: «Продолжение таблицы». Под русским заголовком таблицы должен быть его точный английский перевод.
- Все графы в таблице должны иметь заголовки. В тех графах, в которых это необходимо, после заголовка должны указываться единицы величин, например: Длина бursы цирруса, мм; Экстенсивность инвазии, %; Содержание актина, отн. ед. В таблице разрешается использовать только общепринятые сокращения и сокращения, введенные автором в тексте статьи. Не допускается употребление графических условных обозначений. Если какие-то данные таблицы нуждаются в пояснениях, то эти данные отмечаются надстрочными индексами (^{1,2} для текста и ^{**} для цифр) и поясняются отдельной строкой (строками) под таблицей со словом «Примечание». Таблица не должна иметь левой, правой и нижней границы, а также границ между строками (за исключением строки заголовка).

Иллюстрации

- Цветные рисунки будут опубликованы в электронной версии статей; в печати все иллюстрации чёрно-белые – это необходимо иметь в виду при подборе оттенков.
- Формат рисунков TIFF, LZW упаковка.
- Растровые рисунки: разрешение 600 или 1200 dpi; фотографии: разрешение 300 или 600 dpi.
- Имена файлов иллюстраций должны содержать порядковые номера иллюстраций, например: Fig1.tif, Figs13-18.tif. Каждый файл должен содержать один рисунок или одну таблицу рисунков (фотографий). Рисунок не должен включать в себя подпись («Рисунок 1» и т.п.) и расшифровку условных обозначений: эта информация приводится только в разделе «Подписи к рисункам».

- Отдельные рисунки на таблицах обозначаются цифрами, русскими или английскими (в англоязычной статье) буквами. При ссылке в тексте на рисунок (таблицу рисунков) указывается его номер и буквенные и цифровые обозначения его деталей, например: рис. 1а, кривая 2; рис. 1б, дорожка 3.
- В случае написания на фотографии каких-либо обозначений должен быть представлен второй ее экземпляр — без обозначений.
- Поскольку фотографии печатаются в журнале на отдельной вклейке, рекомендуется давать к статьям четное число фотографий или групп фотографий.
- Каждая статья может сопровождаться не более чем двумя листами вклеек с фотографиями (4 страницы).
- Размер рисунка (таблицы рисунков, фотографий) не должен превышать 20×13 см.

Подписи к рисункам

- Подписи к рисункам (фотографиям) приводятся на отдельном листе в порядке нумерации рисунков. Под каждой подписью дается ее перевод на английский язык.
- Каждый рисунок (таблица рисунков) независимо от количества входящих в него частей должен иметь общую подпись, следом за которой идут необходимые пояснения частей рисунка и обозначений на них. Все символы и сокращения, фигурирующие на рисунке, должны быть объяснены в подписи к нему.
- Слева на полях при первом упоминании каждой таблицы или рисунка необходимо указать их местоположение (см. шаблон).

Публикация перевода в журнале *Entomological Review*

- Статьи на русском языке, посвященные членистоногим, могут быть опубликованы в английском переводе в журнале “*Entomological Review*”. Отбор рукописей осуществляет ред. коллегия журнала «Паразитология» в соответствии с установленным Издательством лимитом на объем переводов.
- Для публикации перевода статьи на английском языке в журнале “*Entomological Review*” авторы после принятия русскоязычной статьи к печати высылают дополнительный заполненный и подписанный авторский договор.
- Автор может выполнить собственный перевод статьи. Все переводы подлежат проверке издательством журнала “*Entomological Review*” и, при необходимости, могут быть подвергнуты стилистическому редактированию. Если материалы, представленные на английском языке, стилистическому и научному редактированию не подвергаются, то публикация таких материалов сопровождается сноской на английском языке: “The article is published in the original” («Статья публикуется в оригинале (авторской редакции)»). Материалы, представленные на английском языке, которые подверглись стилистическому редактированию, сопровождаются сноской: “The text was submitted by the author(s) in English” («Текст представлен автором(ами) на английском языке») или аналогичной по содержанию сноской.
- Качество авторского перевода и возможность его публикации определяется Издательством. Издательство вправе (если авторский перевод не отвечает его требованиям) выполнить перевод оригинального текста на английский язык самостоятельно и с согласия автора опубликовать его либо опубликовать статью в авторском переводе, сопроводив его сноской на английском языке: “The article was translated by the author(s)” («Статья публикуется в переводе автора (ов)»). Файл переведенной и/или отредактированной Издательством статьи направляется на согласование автору по электронной почте. Автор обязан в течение указанного в сопроводительном письме срока ознакомиться с полученным материалом и при наличии замечаний к переводу направить их Издательству. Если в результате перевода или редактирования авторская идея не была искажена, то вмешательство автора в техническую (языковую) сторону перевода не допускается. В случае отсутствия ответа от автора по истечении установленного Издательством в сопроводительном письме срока согласования перевода, Издательство вправе считать перевод согласованным и опубликовать его.