

Laboratorijsko uzgajanje krpelja simulacijom prirodnih uslova

Ispitivana je nova metoda uzgajanja krpelja vrste Ixodes ricinus u laboratorijskim uslovima, zasnovana na simulaciji prirodnih uslova u kojima se oni razvijaju. U tu svrhu, od avgusta do novembra 2003. godine u veterinarskim ambulancama u Subotici i Beogradu vršilo se prikupljanje krpelja sa pasa i mačaka. Od dvanaest sakupljenih ženki vrste Ixodes ricinus ukupno je dobijeno 6000 jaja, od kojih je u stadijum nimfe uspelo da se razvije 2000. Ustanovljeno je da predložena metoda simulacije prirodnih uslova omogućava za 66% veći prinos jedinki ove vrste od ranije korišćenih metoda. Simulacijom uslova prirodne sredine povećana je verovatnoća dobijanja jaja, veći broj dobijenih larvi, kao i veći broj preživelih nimfi.

Uvod

Krpelji su grupa artropoda od izuzetnog biomedicinskog značaja, prvenstveno zbog štetnog delovanja nastalog hemofagim načinom ishrane i oboljenja koja izazivaju. Veliki broj vrsta i relativna monoksenost prema domaćinima čini ih veoma zanimljivim za proučavanje.

Na našim terenima najčešći i najpoznatiji među krpeljima je *Ixodes ricinus* (Pavlović *et al.* 1999; Babenko *et al.* 1977) koji pripada grupi Acarina rodu Ixodes. To je krpelj sa jasno izraženim polnim dimorfizmom, kutikulom, koja prekriva ceo dorzalni deo tela kod mužjaka, dok kod ženke prekriva oko 2/3 tela, ima izražen par očiju, kao i dve bočno postavljene stigme iza trećeg para nogu, prosečna dužina je od 3 do 5 mm, dok nasisana ženka može

biti dugačka i do 1 cm. Nastanjuju sve kopnene površine od severne do južne polarne oblasti, pri čemu preferiraju travnate, žbunaste zajednice (šume, parkovi, stepe, savane) i ruderalna staništa (Gothe 1986).

Ixodes ricinus za razvoj koristi tri domaćina (Gray 1987). U toku sisanja krvi u ovarijumu ženki razvijaju se jaja i nakon kopulacije ženke se odvajaju od domaćina, padaju na zemlju i polažu jaja u travi, žbunju ili ispod opalog lišća (Bouman *et al.* 1999; Černy 1988). Broj jaja se kreće od 300 do 9000, ali ceo proces može katkad da izostane usled pretrpljenog šoka, kao npr. nedostatka prirodne svetlosti, toplote i drugih agenasa, ili usled mogućnosti pada u stanje hibernacije iz kojeg se krpelj teško budi.

Za prvog, prelaznog domaćina se kači po izlaganju jaja, u stadijumu larve u kome ima tri para nogu (Milutinović 1992). Nakon 2 do 4 nedelje dolazi do samoodstranjivanja i kačenja na drugog domaćina na kome se hrani 2 do 5 nedelja kada se na njoj odigravaju određene morfološke promene. Posle druge metamorfoze dolazi do samoodstranjivanja i prelaska na trećeg, konačnog domaćina gde će se preobraziti u odraslu jedinku i fizički se razviti u potpunosti, postati polno zrela jedinka i razmnožavati se.

Hiberniraju u zavisnosti od temperaturnih varijacija u spoljašnjoj sredini. U jesen, kada temperatura opadne ispod 5°C ušuškavaju se u površinski sloj zemlje na dubinu do 7 cm i tu ostaju sve dok temperatura zemljišta ne poraste (Černy *et al.* 1974). Krpelji jedino ne hiberniraju u slučaju kada se prikače na nekog domaćina i na njemu dočekaju zimski period; u tom slučaju domaćin im obezbeđuje toplotu i hranu i krpelj nema nikakvu potrebu za zimskim snom.

Vitomir Đokić (1984), Beograd, Todora Dukina 13, učenik 4. razreda XII beogradske gimnazije "Dimitrije Tucović"

MENTORI:

Dr. Ivan Pavlović, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

Aleksandar Pavličević, dipl. vet. med, Veterinarska laboratorija "Aves", Subotica

Prvi koraci u laboratorijskom odgajanju krpelja, posebno vrste *Ixodes ricinus*, preduzeti su 1986. godine, kada je prvo praški naučnik Stanek sa saradnicima uspeo da održi u životu sve razvojne stadijume ove vrste, a potom ih inficirao sa *Borrelia burgdoferi*. Iste godine, Hueli i saradnici su proučavali ovipoziciju na modelu *Rhipicephalous bursa* i uspeli da odhrane krpelje u laboratoriji (Milutinović 1992). U prvom slučaju radi se o krpeljima čije su larve, a u drugom jajašca pokupljena u prirodi, a zatim prenešena u laboratorijske uslove.

Cilj ovog istraživanja je ispitivanje nove metode uzgajanja krpelja *Ixodes ricinus in vitro*, zasnovane na simulaciji uslova prirodne sredine.

Predloženi metod

Praćenjem životnog ciklusa krpelja došli smo do zaključka da bismo imitacijom istih došli do znatno uspešnijih rezultata u laboratorijskom odgoju, u odnosu na prethodno korišćene metode. Predloženi metod se zasniva na ciklusu polaganja jaja u proleće kada ženke posle zimskog sna iskorišćavaju sve svoje potencijale za ostavljanje što brojnijeg potomstva.

Od prikupljenih krpelja se izdvajaju ženke koje su gravidne i prenose se u posebno pripremljene posude sa zemljom i stavljaju se u frižider na temperaturu od 0 do 4°C u periodu od jedne do dve nedelje. Tako se simuliraju zimski uslovi u kojima ženke ne polažu jaja već se zbog nepogodnih uslova sredine zavlače u zemlju i čekaju pogodne, prolećne uslove.

Posle dve nedelje posude se iznose iz frižidera na sobnu temperaturu, a ženke postavljaju u petrijeve šolje na filter hartiju da bi snele jaja. Povećanjem temperature i svetlosti simulira se stvaranje pogodnijeg perioda u prirodi – proleća. Pošto polože jaja ženke uginu i potrebno ih je ukloniti.

Iz jajašaca se nakon nedelju dana izležu prve larve krpelja koje su gladne i potrebno im je obezbediti domaćina za prehranjivanje. U prirodi se one kače za male sisare: poljske miševe, zečeve, kuniće, lasice i sl. U laboratoriji se prehranjuju postavljanjem na zamorce ili laboratorijske miševe ili pacove. Larve *Ixodes ricinus*-a nisu izbirljive po pitanju domaćina te ih je mnogo lakše odgajiti nego druge vrste.

Pošto se nasisaju krvi, posle nedelju dana larve se uklanjaju sa životinje i postavljaju u posude u kojima se nalazi iznikla trava visine od 2 do 5 cm

gde se one presvlače u nimfe. Za vreme od 1 do 2 dana larve se presvuku u nimfe, dobijaju još jedan par nogu, razvijaju se oči i polni organi i uvećava se zapremina tela. Posle toga posude sa nimfama se stavljaju u frižider na već predloženu temperaturu (od 0 do 4°C).

Na ovaj način, “skraćujući” sva godišnja doba i obezbeđujući sve pogodne uslove povećavamo verovatnoću dobijanja i izleganja jaja, a samim tim i veći prinos u odgoju.

Testiranje metoda

U periodu od avgusta do novembra 2003. godine, u veterinarskim ambulantomama u Subotici i Beogradu vršilo se prikupljanje krpelja sa pasa i mačaka. Pri skidanju krpelja korišćena je pinceta sa zupcima, a potom su uzorci odlagani u bočice, na vodnom natopljenom filter hartiju. Prikupljeno je ukupno 20 krpelja i uz svaki uzorak krpelja veterinar koji je izvršio intervenciju popunjavao je upitnik na kome su beleženi podaci o pacijentu.

Determinacija je vršena u veterinarskoj laboratoriji u Subotici, prema ključu (Kapustin 1955). Od prikupljenih primeraka, 12 su bile ženke i svi uzorci su pripadali vrsti *Ixodes ricinus* (tabela 1). Gravidne ženke su odlagane u plastične posude, dimenzija 10×10×5 centimetara, u kojima se nalazio 3 cm deo sloj zemlje i zasađena trava visine 2 cm.

Tabela 1. Broj položenih jaja svake ženke

Ženka	Broj položenih jaja	Broj larvi koje su se izlegle
G1	500	500
G2	900	300
G3	600	200
G4	0	0
G5	0	0
G6	1400	1600
G7	500	150
G8	700	150
G9	400	250
G10	400	250
G11	400	200
G12	300	200

U cilju izazivanja hibernacije posude su zatim odlagane u frižider na temperaturu od 0 do 4°C. Zemlja u posudama je bila rastresita crnica, kako bi se krpelji što lakše pripremili za hibernaciju, ženke su držane na toj temperaturi 14 dana, pošto je to dovoljno dug period da krpelj padne u zimski san. Po isteku tog perioda provedenog u hibernaciji krpelji su vraćani u bočice na filter papir na koji su polagali jaja. Na taj način dobija se od 300 do 9000 jaja (tabela 1).

Potom su jaja čuvana na temperaturi od 25°C, i nakon izleganja larve su kačene na zamorce. Tehnika odgajanja krpelja na zamorcima je preuzeta od poljskog naučnika Černija (Černy *et al.* 1974; Černy 1981). Od oko šest hiljada larvi postavljenih na zamorca, za njegovu kožu se uhvatilo oko pet hiljada.

Nakon hranjenja, primerci su ostavljani u prethodno pomenutim posudama, na travu. U svaku posudu stavljanje je po pedeset jedinki, pri čemu su posude deljene na četiri dela radi lakšeg praćenja broja preživelih jedinki. Tako napunjene posude su odlagane u frižider na 0 do 4°C da bi se postiglo usporavanje njihovog metabolizma i postizanja stanja hibernacije. Dobijene su jedinke koje su manje od predstavnika njihove vrste koji su othranjeni u prirodnim uslovima i osjetljivije na veća temperaturna kolebanja i vlažnost.

Poređenje sa drugim metodima

Ispitivanjem potencijala dosadašnjih metoda za laboratorijsko uzgajanje otkriveno je nekoliko ključnih mana koje nisu dozvolile dalji razvoj već postojećih metoda. Pre svega, prethodne metode su se zasnivale na prikupljanju ili već izleženih larvi, ili jajašaca iz prirodnog okruženja, i daljoj manipulaciji njihovog odhranjivanja u laboratorijama.

Naša istraživanja ukazuju da prikupljanje gravidnih ženki može da bude najaplikativniji način uzimanja krpelja za biološke oglede pošto omogućava veći prinos jaja krpelja. Naime, dvanaest ženki je ukupno dalo oko 6000 jaja iz kojih je uspešno dobijeno 5000 larvi, a do stadijuma nimfe je othranjeno 2000 krpelja; dve ženke nisu položile jaja; tako su dobijene jedinke koje su manje od predstavnika njihove vrste koji su othranjeni u prirodnim uslovima i osjetljivije na veća temperaturna kolebanja i vlažnost.

U istraživanjima koja su vršili Stanek i saradnici prikupljeni broj jajašaca je iznosio od 5000 do 7500 (Milutinović 1992). Oni su metodom belog plašta prikupljali larve krpelja *I. ricinus*, zatim ih u laboratoriji prenosili u petri šolje u kojima se nalazio vlažni filter papir; potom bi ih Černijevom metodom postavljali na zamorce i ostavljali u periodu od 2 do 5 nedelja da se hrane i izvrše presvlačenje u nimfe. Maksimalan broj krpelja koji su uspeli da othrane bio je 450 jedinki (Gray 1987), a tako dobijene krpelje infestirali su parazitom koji izaziva lajmsku bolest, *Borrelia burgdorferi* i dalje koristili za eksperimente (Dimitrić 1999).

Istraživanja Huelia i saradnika pokazala su da je od istog broja jaja moguće othraniti i do 520 primeraka (Milutinović 1992). Oni su na prirodnim staništima krpelja pronalazili jaja *I. ricinus-a* i *Rhipicephalous bursa*, prikupljali ih pomoću akupunkturnih igala i prenosili ih na suvi filter papir u petri šolje i ostavljali na sobnoj temperaturi 4 nedelje; potom su dobijene larve postavljali na zamorce Černijevom metodom u periodu od 2 do 5 nedelja. Dobijene nimfe su kačili na zamorce u vremenu od 2 nedelje, ali dobijene imago krpelje nisu mogli da koriste za proučavanje ovipozicije jer se mali broj nimfi othranio do stadijuma adulta.

Metod prikupljanja jaja u prirodnim staništima doводи do mogućeg mehaničkog oštećenja kutikule, uginuća larvi pri transportu i konačno stresogeno deluje na samu izvodljivost (izleganje) umanjujući procenat izleganja, a ove posledice nastaju i tokom manipulacije sa jajima i tokom njihovog stavljanja u posude za inkubiranje. Na ovaj način vitalnost pada ispod 30% od one u prirodnim uslovima (Gray 1981).

U stadijumu larve krpelji imaju vrlo osjetljivu kutikulu koja pri mehaničkim pritiscima puca i larve u toku 48 sati uginu, a kod preživelih jedinki javlja se povećani mortalitet jer su neotporne na promenu životnih uslova.

Prikupljanje gravidnih ženki anulira nepovoljne faktore i u dobrim uslovima odgoja (optimum temperature i vlažnosti) one polažu maksimalan broj jaja. Stavljanjem ženki u posude sa zasejanom travom umanjujemo faktor stresa, i ostalih faktora koji utiču na rizik od nepolanja jaja, ali utičemo i na mnogo veću vitalnost samih jaja i procenat izleganja, na šta nam ukazuje i komparacija sa radovima navedenih autora (kod Staneka je to iznosilo 0.06%, kod Huelia 0.10%, a kod nas 67% vitalnih larvi).

Tehnika hranjenja krpelja na zamorcima se tokom godina pokazala kao vrlo uspešna u laboratorijskom uzgajanju krpelja. U uslovima spoljašnje sredine larve i nimfe se kače za sitnije životinje: glodare, zečeve i druge, dok se adultni oblici uglavnom kače za krupnije životinje: pse, mačke, pa čak ako nema dovoljno sisara na određenom prostoru i na ptice (Kulišić *et al.* 1995) i neke vrste reptila (Pavlović i Milutinović 1999).

Odlaganje dobijenih nimfi u kutije sa travom omogućava da se odigra prirodni proces hibernacije i obezbedi i do 95% sigurno polaganje jaja, jer se u prirodi krpelji zarivaju u površinski sloj zemlje, do 7 cm, i tu uspešno prezimljuju, a u proleće polažu jaja. Kada ne bi postojao sloj zemlje u posudi, veliki broj krpelja bi uginuo usled gubitka temperature, a samim tim i vlažnosti.

Zaključak

Predloženi metod omogućava brže, jednostavnije i prilagodljivije odgajanje krpelja u laboratorijskim uslovima. Udeo preživelih larvi je preko 100 puta veći nego u istraživanjima Staneka, Huelia i Greja. Otuda može biti korisna u epidemiološkim istraživanjima preživljavanja i generacijske transmisije pojedinih infektivnih agenasa u krpeljima, kao i boljem upoznavanju njihove ekologije, a može da posluži i kao osnov za dalja akarološka istraživanja. Dalje, metoda omogućava izvođenje eksperimenata u bilo kom godišnjem dobu nezavisno od frekventnosti krpelja u prirodi, jer ne zavisi od prirodnih uslova već od parametara koji su strogo kontrolisani u laboratoriji.

Nedostatak metode se ogleda u tome što, u odnosu na sakupljanje imago krpelja u prirodi, predstavlja samo simulaciju prirodnih uslova i nikako se ne može porediti sa prirodnim ciklusima kojima su krpelji podvrgnuti u prirodi. Dobile su jedinke koje su manje od predstavnika njihove vrste koji su othranjeni u prirodnim uslovima i osetljivije na veća temperaturna kolebanja i vlažnost.

Zahvalnost. Zahvaljujemo se: veterinaru Slobodanu Stevanovu, direktoru Veterinarske ambulante PanVet iz Subotice i veterinarima veterinarske ambulante pri Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu na pomoći pri prikupljanju materijala za ovaj rad. Osoblju Veterinarske ambulante Aves iz Subotice na pruženoj pomoći pri vršenju ovog eksperimenta. Osoblju Instituta za

medicinska istraživanja u Beogradu i vet. med. sci. Dragoljubu Jeremiću iz fabrike lekova Galenika za ekperimentalne životinje korišćene u ovom projektu.

Literatura

Babenko L. V., Arumova E. A., Buš M. A., Skadniš E. A. 1977. O sootnoshenii polov v prirodnih populatsiah imago *Ixodes ricinus* L. i *Ixodes persulcatus* P. SCH (Ixodoidea, Ixodidae). *Medicinskaya Parazitologiya I Parazitarnie Bolezni*, **3** (46): 294.

Bouman E. A. P., Šimek P., Zemek R., Dusbábek F., Zahradníčková H. 1999. Methods in the study of sexual behaviour of the tick *Ixodes ricinus*. XIIIth European Meeting, Society for Vector Ecology, Wageningen (the Netherlands 1999), September 6-11, Book of Abstracts, p. 84

Černý V., Daniel M., Rosický B. 1974. Some features of developmental cycle of the tick *Ixodes ricinus* (L.) (Acarina: Ixodidae). *Folia parasitologica*, **21**: 85.

Černý V. 1981. Survival of ovipositing *Ixodes ricinus* females. *Folia parasitologica*, **28**: 376.

Černý V. 1988. Occurrence of copulating pairs of the tick *Ixodes ricinus* (L.) in nature. *Folia parasitologica*, **35**: 222.

Dimitrić A. 1999. Krpelji kao prenosioci meta-zoonoza. Magistarska teza. Fakultet veterinarske medicine u Beogradu

Göthe R. 1986. Ticks in their epidemiological function as vectors and inducers of diseases. IXth international congress of infectious and parasitic diseases. Munich, July 20-26, abstracts, 357.

Gray J. S. 1981. The fecundity of *Ixodes ricinus* L. and the mortality of its developmental stages under field conditions. *Bulletin of Entomological Research*, **71**: 533.

Gray J. S. 1987. Mating and behavioural diapause in *Ixodes ricinus* L. *Experimental and applied acarology*, **3** (1): 61.

Kapustin F. U. 1955. *Atlas parazitov krovi životnih i kleščei iksodid*. Moskva: Gasudarstvenoe izdatelstvo seljskohajzajstvenoi literaturi

Kulišić Z., Milutinović M., Bobić B., Pavlović I. 1995. Investigation of Ixodid and Argasid tick of same mammals and birds in the extended area of Belgrade. *Acta Veterinaria*, **45**: 323.

Milutinović M. 1992. *Ekološka istraživanja krpelja (Acarina, Ixodoidea, Ixodidae) Srbije*. Beograd: Biološki fakultet

Pavlović I., Milutinović M. 1999. Infestacija ti-grastog pitona (*Python molurus*) i send boe (*Boa constrictor*) krpeljima *Haemophysalis punctata* (Cansterini&Fuzago 1877). U *Zbornik rezimea sim-pozijuma entomologa Srbije '99*, str. 48.

Pavlović I., Milutinović M., Kulišić Z., Dimitrić A., Pavlović V. 1999. Prisustvo artropoda od biomedicinskog značaja na zelenim površinama grada Beograda. U *Zbornik radova II Gradske konferencije o suzbijanju štetnih artropoda i glodara sa međunarodnim značajem*, str. 81-87.

Pomerancev B. L. 1950. *Fauna SSSR. Paukoo-braznie. Iksodovie kleščei (Ixodidae)*. Moskva: Izd. Akadem. Nauk SSSR

Vitomir Djokić

Laboratory Tick Breeding by Simulating Natural Habitat Conditions

In our experiment a new method of laboratorial growing of *Ixodes ricinus* ticks was examined. The gravid females were kept at a temperature of 0 to 4°C for fourteen days. After that the ticks were put at a room temperature in order to lay eggs. The eggs were kept at room temperature so that we could get young larva. Afterwards, the larvae were

put on experimental animals so that they could grow into nymphs. Then, those nymphs were kept at a temperature of 0 to 4°C so that they could be used for other purposes.

The gravid females were put in plastic dishes, sized 10×10×5 cm and filled with 3 cm of soil and 2 cm of grass, and left in a refrigerator at a temperature of 0 to 4°C for 14 days. In this way we simulated natural habitat conditions so that the ticks could hibernate, and after 14 days, if the females are pregnant, to lay eggs. Afterwards the females were put into cups on wet filter paper, so that they could lay down eggs. With this method we succeeded in collecting approximately 6000 eggs. The eggs were held in humid conditions, at room temperature, and from those eggs we obtained 5000 larvae. Those larvae were put, using the Cherny method, onto lab animals and we managed to get 2000 nymphs. In this way the percentage of survived ticks in *in vitro conditions has been enlarged*.

With this method 60% more ticks were obtained than in the researches of Stanek, Gray and Hueli. It has been shown that this method provides safer conditions for females to lay down eggs. In simulating natural habitat conditions we managed to provide a bigger quota and a better starting position for other experiments where a big amount of ticks is necessary.

