ВЕТЕРИНАРНІ НАУКИ

УДК 619:576.8:57.083:616.995.42
DOI https://doi.org/10.37406/2706-9052-2026-2-24

Левицька В. А.
докторка ветеринарних наук,
професорка кафедри інфекційних, інвазійних хвороб та ветеринарного забезпечення кінологічної служби
Національної поліції України
Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»
Кам'янець-Подільський, Україна
E-mail: *levytskav@pdatu.edu.ua*
ORCID: *0000-0003-3100-009X*

Ковальова О. М.
магістр ветеринарної медицини,
аспірантка кафедри інфекційних, інвазійних хвороб та ветеринарного забезпечення кінологічної служби
Національної поліції України
Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»
Кам'янець-Подільський, Україна
E-mail: *frolova.vas4422@gmail.com*
ORCID: *0009-0000-9131-9380*

ШТУЧНЕ МЕМБРАННЕ ЖИВЛЕННЯ КЛІЩІВ ЯК МОДЕЛЬ ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕРЕДАЧІ *BABESIA DIVERGENS*

Анотація

Бабезіоз є одним із найважливіших трансмісивних протозойних захворювань тварин і людини, поширення якого тісно пов'язане з іксодовими кліщами. Вивчення взаємодії між кліщем і збудником потребує контрольованих лабораторних моделей, здатних відтворювати процес зараження без використання лабораторних тварин. Метою роботи було оцінити ефективність штучного мембранного живлення Ixodes ricinus для моделювання передачі Babesia divergens у контрольованих умовах in vitro.

Кліщів I. ricinus збирали у природному середовищі та утримували в мембранних годівницях із силіконовою мембраною. Для живлення використовували дефібриновану кров великої рогатої худоби. У дослідженні сформували дві групи: контрольну, яка отримувала лише цільну кров та дослідну, до якої на 3-й і 7-й день живлення додавали кров, інвазовану культурою B. divergens із рівнем паразитемії 10 %. Після завершення живлення кліщів досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції для виявлення ДНК Babesia spp.

У процесі експерименту кліщі обох груп демонстрували успішне прикріплення до мембрани, стабільне живлення та повне насичення на 9–10-й день. Середня маса насичених самиць становила 237 ± 28 мг у контрольній групі та 221 ± 35 мг у дослідній групі. Рівень летальності залишався низьким і не мав статистично значущих відмінностей між групами. У контрольній групі ДНК Babesia spp. не виявлено, тоді як у групі, що отримувала інвазовану кров, позитивними були 35,8 % самиць. Отримані результати підтвердили ефективність мембранної системи для передачі інвазійного матеріалу та відтворення ранніх етапів взаємодії «кліщ–Babesia».

Запропонована модель є перспективним інструментом для дослідження біології кліщів і механізмів передачі бабезій, а також може бути використана для оцінки впливу різних факторів на процес інвазії, тестування протипаразитарних препаратів і розробки нових підходів до профілактики трансмісивних захворювань.

Ключові слова: *Babesia divergens, іксодові кліщі, штучне живлення, мембранні системи, ПЛР, інвазія.*

Вступ. Штучне мембранне живлення іксодових кліщів є важливим напрямом сучасних ентомологічних і паразитологічних досліджень, що сформувався як відповідь на необхідність зменшення використання лабораторних тварин і стандартизації експериментальних умов. Кліщі, як облігатні гематофаги, характеризуються

© Левицька В. А., Ковальова О. М., 2026

складним процесом живлення, який включає пошук господаря, прикріплення та тривале насичення кров'ю, що може тривати від кількох днів до тижнів залежно від стадії розвитку та виду [12]. Така біологічна складність обумовлює необхідність індивідуального підходу до розробки штучних систем для різних родів і видів кліщів.

Ранні дослідження штучного живлення показали, що ефективність систем значною мірою залежить від здатності відтворювати специфічні стимули прикріплення, характерні для конкретного виду. Наприклад, для *Amblyomma americanum* використання шерсті господаря та сітчастих матеріалів у поєднанні з силіконовими мембранами забезпечувало успішне живлення як німф, так і дорослих особин [9; 16]. У той же час для *Amblyomma hebraeum* було продемонстровано, що різні стадії розвитку потребують різних стимулів: личинки ефективно реагували на екстракти шерсті великої рогатої худоби, німфи – на синтетичні феромони, а дорослі особини – на поєднання шерсті та екскрементів кліщів. Саме завдяки такій стадієспецифічній оптимізації вперше вдалося повністю замкнути життєвий цикл цього виду *in vitro* [21].

Для інших видів кліщів результати були менш успішними. Зокрема, у *Dermacentor reticulatus* навіть за оптимізованих умов штучного живлення спостерігалося, що лише дорослі кліщі досягали повного насичення, тоді як личинки та німфи демонстрували нижчу ефективність прикріплення і живлення [20]. Водночас впровадження напівавтоматизованих систем із перистальтичним насосом дозволило покращити показники насичення і маси кліщів цього виду до рівня, близького або навіть вищого за традиційні методи [4].

У випадку *Amblyomma variegatum* встановлено, що заміна крові на буферні або культуральні середовища суттєво знижує успішність розвитку, зокрема показники линяння становили менше 30% порівняно з контролем на крові [30]. Це підкреслює критичну роль компонентів крові у фізіології живлення кліщів. Водночас додавання фагостимуляторів, таких як АТФ і глюкоза, дозволяє значно покращити результати живлення, особливо на початкових етапах прикріплення [20; 12].

У контексті боротьби з кліщами мембранні системи показали високу ефективність як інструмент для скринінгу акарицидів. Зокрема, у дослідженнях на *A. hebraeum* було встановлено, що навіть низькі концентрації івермектину викликали загибель усіх німф [21]. Подібні результати були отримані для Ixodes ricinus при застосуванні фіпронілу та перметрину, причому ефект мав чіткий дозозалежний ефект [19].

Окремої уваги заслуговує можливість використання мембранних систем для дослідження секреторних процесів кліщів, зокрема формування «цементу» та складу слини, які відіграють ключову роль у прикріпленні, живленні та передачі збудників захворювань. Відомо, що під час живлення іксодові кліщі виділяють складний коктейль біологічно активних молекул, включаючи антикоагулянти, імуномодулюючі фактори та ферменти, які забезпечують тривале утримання на господарі та ефективне всмоктування крові [8]. Формування «цементної пробки», що секретується слинними залозами, є критичним для стабільної фіксації кліща, причому її структура і кількість можуть варіювати між видами [27]. Використання силіконових мембран у системах штучного живлення дозволяє отримувати «цемент» без домішок тканин господаря, що значно полегшує їх морфологічний і молекулярний аналіз [9]. Крім того, такі системи дають змогу досліджувати динаміку секреції слини та роль окремих білків у процесах осморегуляції і передачі патогенів, зокрема через аналіз експресії генів та функціональних білків у кліщів, що живляться *in vitro* [10; 25].

Мембранні системи також широко застосовуються для дослідження взаємодії кліщів із збудниками захворювань. Наприклад, для *Ixodes scapularis* було показано, що штучне живлення інфікованою кров'ю дозволяє ефективно моделювати передачу Borrelia burgdorferi та виявляти білки, необхідні для виживання спірохет в організмі кліща [24]. Аналогічно, для *Dermacentor andersoni* було продемонстровано можливість дослідження взаємодії з *Anaplasma marginale* у контрольованих умовах, включаючи аналіз реплікації збудника [29].

Особливий інтерес становлять дослідження виду *I. ricinus,* який є важливим переносником збудників хвороби Лайма. Для цього виду було показано, що використання силіконових мембран із додаванням екстрактів шерсті великої рогатої худоби та CO_2 значно підвищує рівень прикріплення і насичення [19]. Крім того, мембранні системи дозволили дослідити фізіологічні процеси, зокрема роль аквапоринів у регуляції водного балансу, що має потенційне значення для розробки нових методів контролю кліщів [10].

Бабезіоз є одним із найпоширеніших трансмісивних протозойних захворювань тварин і людини, що має суттєве ветеринарне, медичне та економічне значення. Збудники роду *Babesia* уражають широкий спектр хребетних господарів, зокрема велику та дрібну рогату худобу, коней, собак і людину, спричиняючи гострі та хронічні форми захворювання з високою варіабельністю клінічного перебігу [13; 15]. У тваринництві бабезіоз асоціюється зі зниженням продуктивності, репродуктивних показників, підвищеною летальністю та необхідністю витрат на лікування і профілактику, що в сукупності формує значні економічні збитки для аграрного сектору [3; 26].

Епізоотологія бабезіозу тісно пов'язана з біологією та екологією іксодових кліщів, які виступають переносниками та проміжними хазяями *Babesia* spp. Зміни клімату, розширення ареалів популяцій кліщів і зростання інтенсивності тваринництва сприяють збільшенню ризику передачі цих протозойних збудників та ускладнюють контроль цього захворювання [11; 14]. У зв'язку з цим поглиблене вивчення взаємодії між паразитом і переносником, механізмів зараження, розвитку та персистенції бабезій в організмі кліща є ключовою умовою для розробки ефективних стратегій профілактики та контролю бабезіозу [17].

Мета роботи: дослідити взаємодію "кліщ–*Babesia*" в контрольованих умовах шляхом моделювання процесу зараження без використання лабораторних тварин. Це дозволяє не лише відтворювати процес живлення

кліщів, але й отримувати нові знання про видоспецифічні особливості їхньої біології, фізіології та взаємодії зі збудниками хвороб. Подальше вдосконалення цих систем, з урахуванням специфіки окремих видів, має ключове значення для розвитку як фундаментальних, так і прикладних досліджень у галузі паразитології в Україні.

Виклад основного матеріалу дослідження. Кліщів *I. ricinus* збирали у природному середовищі за загальноприйнятими методиками.

Штучне живлення кліщів проводили за допомогою мембранних годівниць, виготовлених відповідно до методики, описаної Крьобером Т. та Гереном П. М. [19]. Цільну кров великої рогатої худоби дефібринували, додавали гентаміцин (5 мкг/мл), після чого по 3 мл вносили у лунки та замінювали кожні 12 годин.

Для досліджень 10 самиць кліщів розміщували у годівниці, вистеленій тонкою (80–120 мкм) силіконовою мембраною, попередньо обробленою екстрактом хутра великої рогатої худоби, згідно з протоколом Крьобера Т. та Герена П. М. [19]. Через 24 години неактивних або загиблих самиць видаляли, а до прикріплених додавали відповідну кількість самців.

У дослідженні використовували дві експериментальні групи кліщів. Перша група слугувала контролем і отримувала лише цільну дефібриновану кров. Друга група отримувала кров, інвазовану культурою *B. divergens* з 10 % рівнем паразитемії, яку вводили до годівниць на 3-й та 7-й день від початку живлення. Така схема забезпечувала моделювання динамічного надходження інвазійного матеріалу, що відображає природні коливання рівня паразитемії у хребетного хазяїна та дозволяє оцінити вплив ступеня зараження на процеси прикріплення, насичення та подальшої колонізації кліща.

Живлення продовжували до моменту повного насичення кров'ю та відпадання кліщів. Після завершення живлення проводили відбір повністю насичених особин, візуальний контроль розмірів та подальше документування ступеня збільшення маси.

Після цього від кожного кліща індивідуально виділяли ДНК. Отримані екстракти зберігали при −20 °C до подальшого використання у молекулярно-генетичних дослідженнях, зокрема ПЛР.

Для ампліфікації використовували універсальні праймери для *Babesia* spp.: Bab_F (F: GYYTTGTAATTGGAATGATGG) та Bab_R (R: CCAAAGACTTTGATTTCTCTC). ПЛР-реакції готували в об'ємі 25 мкл, що містили 12,5 мкл FastStart™ PCR Master (Roche, Швейцарія), по 2,5 мкл кожного праймера, 3 мкл зразка ДНК та 4,5 мкл стерильної води.

Ампліфікацію проводили на термоциклері Bio-Rad T100 за наступних умов: початкова денатурація при 95 °C протягом 10 хв; 39 циклів (95 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 40 с), фінальне подовження при 72 °C протягом 7 хв.

Амплікони аналізували методом електрофорезу в 1% агарозному гелі, фарбували бромистим етидієм та візуалізували за допомогою ультрафіолетового трансілюмінатора (UVP). Усі продукти ПЛР очищали з використанням набору NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Німеччина) та секвенували.

Отримані послідовності вирівнювали за допомогою програмного забезпечення Geneious Prime та порівнювали з доступними в базі даних GenBank за допомогою алгоритму BLAST (nucleotide–nucleotide).

Статистичний аналіз результатів проводили з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Для порівняння частот між групами застосовували точний критерій Фішера (Fisher's exact test). Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

У ході експерименту застосовували шестилункові планшети, заповнені цільною або інвазованою кров'ю, що слугувала живильним субстратом під час мембранного живлення кліщів; поверх лунок встановлювали мембранні годівниці, попередньо підготовлені для забезпечення прикріплення самиць *I. ricinus*, після чого їх розміщували в інкубаторі при температурі 38 ^{0}C для підтримання стабільних умов живлення (рис. 1).

У дослідженні було використано 12 мембранних годівниць (лунок): шість контрольних, у яких кліщі отримували лише цільну дефібриновану кров та шість експериментальних, до яких на 3-й і 7-й день живлення додавали кров, інвазовану культурою *B. divergens* (рис. 1). Початкове прикріплення самиць протягом перших 24 годин не відрізнялося між групами. У процесі експерименту спостерігали формування щільного скупчення кліщів на внутрішній поверхні мембрани та поступове їхнє насичення, що супроводжувалося зміною розміру й забарвлення тіла самиць. Із 120 самиць, внесених у годівниці, протягом перших 24 годин прикріпилися 107 (89,2 %), тоді як 13 особин були неактивними або загинули та були видалені з експерименту. У дослідній групі прикріпилось 53 особини, у контрольній – 54. Після стабільного формування контактів із мембраною кліщі обох груп демонстрували порівнянні поведінкові показники та адаптацію до умов живлення.

На 9–10-й день від початку експерименту спостерігалося повне насичення та відпадання кліщів. Успішність насичення залишалася високою в обох групах. Середня маса самиць після відпадання становила 237 ± 28 мг у контрольній групі та 221 ± 35 мг у групі, що отримувала інвазовану кров. Рівень летальності протягом усього періоду експозиції також не відрізнявся: 10 % (6 особин) у контролі проти 11,6 % (7 особин) в дослідній групі, що свідчить про відсутність негативного впливу інвазованої крові на життєздатність самиць.

Після завершення живлення всі кліщі були досліджені індивідуально методом ПЛР. У контрольних лунках жодного ПЛР-позитивного кліща не виявлено (0/54), тоді як у групі з інвазованою кров'ю позитивними були 35,8 % самиць (19/53). Різниця між групами була статистично значущою ($p < 0.001$), що підтверджує ефективність моделі мембранного живлення для передачі інвазійного матеріалу (табл. 1).



А Б В

Рис. 1. Штучне мембранне живлення кліщів у лабораторних умовах: шестилунковий планшет із кров'ю (А); прикріплення кліщів до мембрани і процес живлення (Б); морфометрична оцінка насичених самиць після відпадання (В)

Таблиця 1. Частка інвазованих кліщів культурою *B. divergens* у дослідній та контрольній групах

Група	Кліщів прикріпилось/інвазовано у лунці						
	1	2	3	4	5	6	Всього
Дослідна	9/2	11/4	9/3	9/4	7/3	8/3	53/19
Контрольна	9/0	8/0	7/0	9/0	12/0	9/0	54/0

Аналіз інтенсивності ПЛР-сигналу показав, що у більшості інвазованих кліщів (68,4 %) рівень ДНК *Babesia* був низьким, що може свідчити про ранню стадію інвазії. Варіабельність між експериментальними лунками залишалася в межах очікуваної для мембранних систем: частка інвазованих кліщів коливалася від 22,2 % до 44,4 %, що свідчить про відсутність статистично значущих відмінностей і відображає природну індивідуальну варіабельність успішності інвазії. Отримані результати демонструють, що додавання інвазованої крові на 3-й і 7-й день не впливає на фізіологічні параметри живлення кліщів, проте забезпечує стабільну та відтворювану передачу збудника у штучній системі *in vitro*. Це підтверджує ефективність запропонованої моделі для подальших досліджень взаємодії «кліщ–паразит» та механізмів інвазії.

Штучне живлення кліщів із застосуванням інвазованої крові є ключовим інструментом для дослідження взаємодії збудника з проміжним хазяїном, механізмів передачі та стадій розвитку без використання хребетних тварин [6; 19]. Найпоширеніші підходи базуються на мембранному годуванні, яке використовує природні (шкіра тварин) або синтетичні мембрани, а також на системах культивування заражених еритроцитів *in vitro* [1; 18]. Такі методи забезпечують контрольовані умови зараження, дають змогу вивчати часову динаміку розвитку паразита в тілі кліща та отримувати інвазійні стадії *Babesia*, хоча й потребують видоспецифічної оптимізації та мають ризики контамінації й варіабельності передачі [7; 20].

Комплементарним компонентом мембранного живлення є культивування *Babesia* в еритроцитах хребетних *in vitro*, яке забезпечує стандартизоване джерело зараженої крові. Крім того, лабораторні моделі та *ex vivo*-підходи дозволяють досліджувати взаємодію збудника з тканинами переносника поза організмом хребетного [1; 2]. У нашому дослідженні продемонстровано, що штучне мембранне живлення кліщів на цільній дефібринованій крові та інвазованій крові, з 10 % рівнем паразитемії *B. divergens* (доданої на 3-й та 7-й день), забезпечує стабільні показники прикріплення та повного насичення самиць за відсутності статистично значущих відмінностей між групами. Такий результат узгоджується з попередніми дослідженнями, в яких показано, що наявність паразита в крові зазвичай не має суттєвого впливу на поведінку живлення кліщів за умови оптимальних фізико-хімічних параметрів середовища (температура, в'язкість, склад мембрани) [12].

Використання молекулярних та імунологічних методів (кількісна ПЛР у реальному, непрямий імунофлуоресцентний тест, ПЛР) у поєднанні із лабораторними моделями розведення кліщів, стало важливим інструментом для кількісної оцінки рівня інвазії, візуалізації міграції паразита та визначення часових «критичних точок» передачі збудника. Наприклад, *B. microti* долає середню кишку *Haemaphysalis longicornis* протягом перших 24 годин після насичення [22], а трансоваріальна передача у цій системі становила близько 30 % заражених самок [28]. Отримана частка ПЛР-позитивних самок у групі, що отримувала інвазовану кров (35,8 %), є подібною до опублікованих даних щодо штучного живлення *Haemaphysalis longicornis* та *I. ricinus*. У роботі Бонне С. та співавт. показано, що при живленні *I. ricinus* кров'ю, інвазованою *B. divergens*, ДНК паразита виявляли у значної частини кліщів, із подальшою трансоваріальною та трансстадіальною передачею [6]. Подібно, Умемія-Шірафудзі Р. та співавт. продемонстрували трансоваріальну персистенцію ДНК *B. ovata* у *H. longicornis* при напівштучному живленні, при цьому частка ПЛР-позитивних особин варіювала залежно від умов експерименту [28]. Таким чином, виявлений у нашій роботі рівень інвазії (~1/3 самиць) відповідає загальній тенденції помірної, але відтворюваної ефективності передачі *Babesia* у моделях мембранного живлення.

Важливою особливістю нашого підходу є відстрочене додавання інвазованої крові (на 3-й і 7-й день живлення), що імітує коливання рівня паразитемії у природного хазяїна. Більшість існуючих моделей передбачають внесення інвазованої крові від початку живлення та зосереджуються переважно на загальній здатності паразита

до інвазування кліща. Отримані нами результати свідчать, що навіть при пізнішому надходженні інвазійного матеріалу, бабезії здатні ефективно колонізувати частину популяції кліщів, що узгоджується з експериментальними моделями «кліщ–*Babesia*», де показано адаптивність паразита до різних режимів експозиції.

Попри значний прогрес, штучне живлення залишається чутливим до низки технічних та біологічних факторів. Оптимізація мембран, циркадних умов та складу крові є критично важливою для різних видів і стадій кліщів [19; 20]. Антибіотики, що застосовують для профілактики контамінації, можуть негативно впливати на ендосимбіонтів кліща й знижувати успішність яйцекладки, що створює баланс між стерильними умовами та біологічною доцільністю експерименту [23]. Крім того, молекулярні бар'єри кліща, такі як вітілогеніни, визначають успішність колонізації паразитом; їхній нокдаун за допомогою RNAi здатний змінювати рівні інвазії [5].

Таким чином, штучні системи живлення кліщів у поєднанні з *in vitro*-культивуванням *Babesia* та сучасними молекулярними методами становлять потужний інструментарій для вивчення біології паразита, оцінки трансоваріальної та трансстадійної компетентності та розробки нових стратегій запобігання захворюванням. Вони дають змогу моделювати інвазійний процес, досліджувати механізми та окремі молекули, проводити скринінг вакцин або препаратів та водночас зменшують необхідність використання живих тварин у лабораторній практиці.

Висновки. Отже, отримані нами результати підтверджують, що проста система мембранного живлення на дефібринованій крові з відстроченим додаванням інвазованої крові є ефективною для відтворення ранніх етапів взаємодії збудника захворювання та переносника *in vitro*. Вона дає порівняні з літературними даними рівні інвазії, не погіршує показники прикріплення й насичення самиць та може бути надалі використана як платформа для: тестування різних рівнів інвазії та режимів експозиції, поєднання з молекулярними та іншими методами для картування міграції паразита в тілі кліща, вивчення впливу модифікації живильного середовища та мікробіоти на ефективність передавання Babesia та пошуку терапевтичних засобів для лікування бабезіозу.

Таким чином, запропонована модель є перспективним інструментом як для фундаментальних досліджень біології кліщів, як переносників збудників захворювань, так і для прикладних завдань, зокрема скринінгу протипаразитарних препаратів і розробки нових підходів до профілактики бабезіозу, включно з стратегіями розробки вакцин.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні трансоваріальної та трансстадіальної передачі *B. divergens* із використанням запропонованої моделі штучного мембранного живлення кліщів. Подальші дослідження передбачатимуть молекулярно-генетичне виявлення збудника в різних стадіях розвитку кліщів та оцінювання ефективності його передачі потомству. Отримані результати дадуть змогу розширити уявлення про роль кліщів у підтриманні та поширенні *B. divergens.*

Список використаних джерел

1. Álvarez J. A., Rojas C., Figueroa J. V., Castañeda R. An overview of current knowledge on in vitro Babesia cultivation for production of live attenuated vaccines for bovine babesiosis in Mexico. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020. Vol. 7. № 364. DOI: https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00364

2. Bell-Sakyi L., Zweygarth E., Blouin E. F., Gould E. A., Jongejan F. Tick cell lines: Tools for tick and tick-borne disease research. *Trends in Parasitology.* 2007. Vol. 23(9). P. 450–457. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.07.009

3. Bock R. E., Jackson L. A., de Vos A. J., Jorgensen W. K. Babesiosis of cattle. *Parasitology.* 2004. Vol. 129(S1). P. S247–S269. DOI: https://doi.org/10.1017/S0031182004005190

4. Böhme B., Krull C., Clausen P.-H., Nijhof A. M. Evaluation of a semi-automated in vitro feeding system for Dermacentor reticulatus and Ixodes ricinus adults. *Parasitology Research*. 2018. Vol. 117. P. 565–570. DOI: https://doi.org/10.1007/s00436-017-5648-y

5. Boldbaatar D., Battsetseg B., Matsuo T., Hatta T., Umemiya-Shirafuji R., Xuan X., Fujisaki K. Tick vitellogenin receptor reveals critical role in oocyte development and transovarial transmission of Babesia parasite. *Biochemistry and Cell Biology.* 2008. Vol. 86(4). P. 331–344. DOI: https://doi.org/10.1139/O08-071

6. Bonnet S., Jouglin M., Malandrin L., Becker C., Agoulon A., L'Hostis M., Chauvin A. Transstadial and transovarial persistence of Babesia divergens DNA in Ixodes ricinus ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology.* 2007. Vol. 134(2). P. 197–207. DOI: https://doi.org/10.1017/S0031182006001545

7. Bonnet S. I., Nadal C. Experimental Infection of Ticks: An Essential Tool for the Analysis of Babesia Species Biology and Transmission. *Pathogens*. 2021. Vol. 10(11). № 1403. DOI: https://doi.org/10.3390/pathogens10111403

8. Bowman A. S., Sauer J. R. Tick salivary glands: Function, physiology and future. *Parasitology.* 2004. Vol. 129(S1). P. S67–S81. DOI: https://doi.org/10.1017/S0031182004006468

9. Bullard R., Allen P., Chao C. C., Douglas J., Das P., Morgan S. E., Ching W. M., Karim S. Structural characterization of tick cement cones collected from in vivo and artificial membrane blood-fed Lone Star ticks (Amblyomma americanum). Ticks and *Tick-borne Diseases.* 2016. Vol. 7(5). P. 880–892. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.006

10. Campbell E. M., Burdin M., Hoppler S., Bowman A. S. Role of an aquaporin in the sheep tick Ixodes ricinus: Assessment as a potential control target. *International Journal for Parasitology.* 2010. Vol. 40(1). P. 15–23. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.06.010

11. Estrada-Peña A., Ayllón N., de la Fuente J. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Frontiers in Physiology.* 2012. Vol. 3. № 64. DOI: https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00064

12. González J., Bickerton M., Toledo A. Applications of artificial membrane feeding for ixodid ticks. *Acta Tropica.* 2021. Vol. 215. № 105818. DOI: https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105818

13. Gray J., Zintl A., Hildebrandt A., Hunfeld K. P., Weiss L. Zoonotic babesiosis: Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. Ticks and Tick-borne *Diseases.* 2010. Vol. 1(1). P. 3–10. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2009.11.003

14. Gray J. S., Dautel H., Estrada-Peña A., Kahl O., Lindgren E. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.* 2009. Vol. 2009. P. 1–12. DOI: https://doi.org/10.1155/2009/593232

15. Hildebrandt A., Gray J. S., Hunfeld K. P. Human babesiosis in Europe: What clinicians need to know. *Infection*. 2013. Vol. 41(6). P. 1057–1072. DOI: https://doi.org/10.1007/s15010-013-0526-8
16. Hollmann T., Kim T. K., Tirloni L., Radulović Ž. M., Pinto A. F. M., Diedrich J. K., Yates J. R., 3rd, da Silva Vaz I., Jr., Mulenga A. Identification and characterization of proteins in the Amblyomma americanum tick cement cone. *International Journal for Parasitology.* 2018. Vol. 48(3–4). P. 211–224. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.08.018
17. Jongejan F., Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology.* 2004. Vol. 129(S1). P. S3–S14. DOI: https://doi.org/10.1017/S0031182004005967
18. Kaufman W. R. Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2010. Vol. 1(1). P. 11–22. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2009.12.001
19. Kröber T., Guerin P. M. An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Management Science.* 2007. Vol. 63(1). P. 17–22. DOI: https://doi.org/10.1002/ps.1293
20. Krull C., Böhme B., Clausen P. H., Nijhof A. M. Optimization of an artificial tick feeding assay for Dermacentor reticulatus. *Parasites & Vectors*. 2017. Vol. 10. № 60. DOI: https://doi.org/10.1186/s13071-017-2000-4
21. Kuhnert F., Diehl P.-A., Guerin P. M. The life-cycle of the bont tick Amblyomma hebraeum in vitro. *International Journal for Parasitology.* 1995. Vol. 25(8). P. 887–896. DOI: https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00009-q
22. Kusakisako K., Maeda H., Galay R. L., Matsuo T., Tsujio M., Umemiya-Shirafuji R., Mochizuki M., Fujisaki K., Tanaka T. The vector potential of Haemaphysalis longicornis ticks for Babesia microti parasites under experimental condition. *Journal of Protozoology Research.* 2015. Vol. 25(1–2). P. 8–17. DOI: https://doi.org/10.32268/jprotozoolres.25.1-2_8
23. Narasimhan S., Fikrig E. Tick microbiome: The force within. Trends in *Parasitology.* 2015. Vol. 31(7). P. 315–323. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.010
24. Oliver J. D., Lynn G. E., Burkhardt N. Y., Price L. D., Nelson C. M., Kurtti T. J., Munderloh U. G. Infection of immature Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) by membrane feeding. *Journal of Medical Entomology.* 2016. Vol. 53(2). P. 409–415. DOI: https://doi.org/10.1093/jme/tjv241
25. Perner J., Kropáčková S., Kopáček P., Ribeiro J. M. C. Sialome diversity of ticks revealed by RNAseq of single tick salivary glands. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2018. Vol. 12(4). № e0006410. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006410
26. Schnittger L., Rodriguez A. E., Florin-Christensen M., Morrison D. A. Babesia: a world emerging. *Infection, Genetics and Evolution.* 2012. Vol. 12(8). P. 1788–1809. DOI: https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004
27. Suppan J., Engel B., Marchetti-Deschmann M., Nürnberger S. Tick attachment cement: Reviewing the mysteries of a biological skin plug system. *Biological Reviews.* 2018. Vol. 93(2). P. 1056–1076. DOI: https://doi.org/10.1111/brv.12384
28. Umemiya-Shirafuji R., Hatta T., Okubo K., Sato M., Maeda H., Kume A., Yokoyama N., Igarashi I., Fujisaki K., Suzuki H. Transovarial persistence of Babesia ovata DNA in a hard tick, Haemaphysalis longicornis, in a semi-artificial mouse skin membrane feeding system. *Acta Parasitologica.* 2017. Vol. 62(4). P. 836–841. DOI: https://doi.org/10.1515/ap-2017-0100
29. Vimonish R., Johnson W. C., Mousel M. R., Brayton K. A., Scoles G. A., Noh S. M., Ueti M. W. Quantitative analysis of Anaplasma marginale acquisition and transmission by Dermacentor andersoni fed in vitro. *Scientific Reports.* 2020. Vol. 10. № 470. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-019-57390-y
30. Voigt W. P., Young A. S., Mwaura S. N., Nyaga S. G., Njihia G. M., Mwakima F. N., Morzaria S. P. In vitro feeding of instars of the ixodid tick Amblyomma variegatum on skin membranes and its application to the transmission of Theileria mutans and Cowdria ruminantium. *Parasitology*. 1993. Vol. 107(3). P. 257–263. DOI: https://doi.org/10.1017/S0031182000079233

Levytska V. A.
Doctor of Veterinary Sciences,
Professor at the Department of Infectious and Invasive Diseases and Veterinary Support
of the Cynological Service of the National Police of Ukraine
Higher educational institution "Podillia State University"
Kamianets-Podilskyi, Ukraine
E-mail: *levytska28@gmail.com*
ORCID: *0000-0003-3100-009X*

Kovalova O. M.
Master of Veterinary Medicine,
Postgraduate Student at the Department of Infectious and Invasive Diseases and Veterinary Support
of the Cynological Service of the National Police of Ukraine
Higher educational institution "Podillia State University"
Kamianets-Podilskyi, Ukraine
E-mail: *frolova.vas4422@gmail.com*
ORCID: *0009-0000-9131-9380*

ARTIFICIAL MEMBRANE FEEDING OF TICKS AS A MODEL FOR STUDYING THE TRANSMISSION OF *BABESIA DIVERGENS*

Abstract

Babesiosis is one of the most important tick-borne protozoan diseases affecting animals and humans, and its transmission is closely associated with Ixodid ticks. Investigation of tick–pathogen interactions requires controlled laboratory models capable of reproducing the infection process without the use of vertebrate animals. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of artificial membrane feeding of Ixodes ricinus for modeling the transmission of Babesia divergens under controlled in vitro conditions.

Ticks of the species I. ricinus were collected in natural habitats and maintained in membrane feeding units equipped with silicone membranes. Defibrinated bovine blood was used as the feeding substrate. Two experimental groups were established: a control group receiving only whole blood and an experimental group supplied with blood infected with a B. divergens culture with 10 % parasitemia on days 3 and 7 of feeding. After completion of feeding, ticks were individually analyzed by polymerase chain reaction to detect Babesia spp. DNA.

During the experiment, ticks from both groups demonstrated successful attachment to the membrane, stable feeding activity, and complete engorgement within 9–10 days. The mean weight of engorged females was 237 ± 28 mg in the control group and 221 ± 35 mg in the experimental group. Mortality remained low and did not differ significantly between groups. No Babesia spp. DNA was detected in the control group, whereas 35.8 % of females from the experimental group were polymerase chain reaction positive. These results confirmed the effectiveness of the membrane feeding system for transmission of infectious material and reproduction of the early stages of tick–Babesia interaction.

The proposed model represents a promising tool for studying tick biology and mechanisms of Babesia transmission and may also be applied for evaluating factors influencing parasite invasion, testing antiparasitic compounds and developing new approaches for the prevention of tick-borne diseases.

Key words: *Babesia divergens, Ixodid ticks, artificial feeding, membrane feeding system, PCR, parasite transmission.*

References

1. Álvarez, J. A., Rojas, C., Figueroa, J. V., & Castañeda, R. (2020). An overview of current knowledge on in vitro Babesia cultivation for production of live attenuated vaccines for bovine babesiosis in Mexico. *Frontiers in Veterinary Science,* 7, 364. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00364 [in English].

2. Bell-Sakyi, L., Zweygarth, E., Blouin, E. F., Gould, E. A., & Jongejan, F. (2007). Tick cell lines: Tools for tick and tick-borne disease research. *Trends in Parasitology*, 23(9), 450–457. https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.07.009 [in English].

3. Bock, R. E., Jackson, L. A., de Vos, A. J., & Jorgensen, W. K. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology,* 129(S1), S247–S269. https://doi.org/10.1017/S0031182004005190 [in English].

4. Böhme, B., Krull, C., Clausen, P.-H., & Nijhof, A. M. (2018). Evaluation of a semi-automated in vitro feeding system for Dermacentor reticulatus and Ixodes ricinus adults. *Parasitology Research,* 117, 565–570. https://doi.org/10.1007/s00436-017-5648-y [in English].

5. Boldbaatar, D., Battsetseg, B., Matsuo, T., Hatta, T., Umemiya-Shirafuji, R., Xuan, X., & Fujisaki, K. (2008). Tick vitellogenin receptor reveals critical role in oocyte development and transovarial transmission of Babesia parasite. *Biochemistry and Cell Biology,* 86(4), 331–344. https://doi.org/10.1139/O08-071 [in English].

6. Bonnet, S., Jouglin, M., Malandrin, L., Becker, C., Agoulon, A., L'Hostis, M., & Chauvin, A. (2007). Transstadial and transovarial persistence of Babesia divergens DNA in Ixodes ricinus ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology,* 134(2), 197–207. https://doi.org/10.1017/S0031182006001545 [in English].

7. Bonnet, S. I., & Nadal, C. (2021). Experimental Infection of Ticks: An Essential Tool for the Analysis of Babesia Species Biology and Transmission. *Pathogens,* 10(11), 1403. https://doi.org/10.3390/pathogens10111403 [in English].

8. Bowman, A. S., & Sauer, J. R. (2004). Tick salivary glands: Function, physiology and future. *Parasitology,* 129(S1), S67–S81. https://doi.org/10.1017/S0031182004006468 [in English].

9. Bullard, R., Allen, P., Chao, C. C., Douglas, J., Das, P., Morgan, S. E., Ching, W. M., & Karim, S. (2016). Structural characterization of tick cement cones collected from in vivo and artificial membrane blood-fed Lone Star ticks (Amblyomma americanum). *Ticks and Tick-borne Diseases,* 7(5), 880–892. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.006 [in English].

10. Campbell, E. M., Burdin, M., Hoppler, S., & Bowman, A. S. (2010). Role of an aquaporin in the sheep tick Ixodes ricinus: Assessment as a potential control target. *International Journal for Parasitology,* 40(1), 15–23. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.06.010 [in English].

11. Estrada-Peña, A., Ayllón, N., & de la Fuente, J. (2012). Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Frontiers in Physiology*, 3, 64. https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00064 [in English].

12. González, J., Bickerton, M., & Toledo, A. (2021). Applications of artificial membrane feeding for ixodid ticks. *Acta Tropica,* 215, 105818. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105818 [in English].

13. Gray, J., Zintl, A., Hildebrandt, A., Hunfeld, K. P., & Weiss, L. (2010). Zoonotic babesiosis: Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks and Tick-borne Diseases,* 1(1), 3–10. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2009.11.003 [in English].

14. Gray, J. S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., & Lindgren, E. (2009). Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary* Perspectives on Infectious Diseases, 2009, 1–12. https://doi.org/10.1155/2009/593232 [in English].

15. Hildebrandt, A., Gray, J. S., & Hunfeld, K. P. (2013). Human babesiosis in Europe: What clinicians need to know. *Infection,* 41(6), 1057–1072. https://doi.org/10.1007/s15010-013-0526-8 [in English].

16. Hollmann, T., Kim, T. K., Tirloni, L., Radulović, Ž. M., Pinto, A. F. M., Diedrich, J. K., Yates, J. R., 3rd, da Silva Vaz, I., Jr., & Mulenga, A. (2018). Identification and characterization of proteins in the Amblyomma americanum tick cement cone. *International Journal for Parasitology,* 48(3–4), 211–224. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.08.018 [in English].

17. Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology,* 129(S1), S3–S14. https://doi.org/10.1017/S0031182004005967 [in English].

18. Kaufman, W. R. (2010). Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. *Ticks and Tick-borne Diseases,* 1(1), 11–22. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2009.12.001 [in English].

19. Kröber, T., & Guerin, P. M. (2007). An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Management Science,* 63(1), 17–22. https://doi.org/10.1002/ps.1293 [in English].

20. Krull, C., Böhme, B., Clausen, P. H., & Nijhof, A. M. (2017). Optimization of an artificial tick feeding assay for Dermacentor reticulatus. *Parasites & Vectors,* 10, 60. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2000-4 [in English].

21. Kuhnert, F., Diehl, P.-A., & Guerin, P. M. (1995). The life-cycle of the bont tick Amblyomma hebraeum in vitro. *International Journal for Parasitology*, 25(8), 887–896. https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00017-X [in English].

22. Kusakisako, K., Maeda, H., Galay, R. L., Matsuo, T., Tsujio, M., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K., & Tanaka, T. (2015). The vector potential of Haemaphysalis longicornis ticks for Babesia microti parasites under experimental condition. *Journal of Protozoology Research*, 25(1–2), 8–17 [in English].

23. Narasimhan, S., & Fikrig, E. (2015). Tick microbiome: The force within. *Trends in Parasitology,* 31(7), 315–323. https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.010 [in English].

24. Oliver, J. D., Lynn, G. E., Burkhardt, N. Y., Price, L. D., Nelson, C. M., Kurtti, T. J., & Munderloh, U. G. (2016). Infection of immature Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) by membrane feeding. *Journal of Medical Entomology*, 53(2), 409–415. https://doi.org/10.1093/jme/tjv241 [in English].

25. Perner, J., Kropáčková, S., Kopáček, P., & Ribeiro, J. M. C. (2018). Sialome diversity of ticks revealed by RNAseq of single tick salivary glands. *PLoS Neglected Tropical Diseases,* 12(4), e0006410. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006410 [in English].

26. Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). Babesia: a world emerging. *Infection, Genetics and Evolution,* 12(8), 1788–1809. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004 [in English].

27. Suppan, J., Engel, B., Marchetti-Deschmann, M., & Nürnberger, S. (2018). Tick attachment cement: Reviewing the mysteries of a biological skin plug system. *Biological Reviews*, 93(2), 1056–1076. https://doi.org/10.1111/brv.12384 [in English].

28. Umemiya-Shirafuji, R., Hatta, T., Okubo, K., Sato, M., Maeda, H., Kume, A., Yokoyama, N., Igarashi, I., Fujisaki, K., & Suzuki, H. (2017). Transovarial persistence of Babesia ovata DNA in a hard tick, Haemaphysalis longicornis, in a semi-artificial mouse skin membrane feeding system. *Acta Parasitologica,* 62(4), 836–841. https://doi.org/10.1515/ap-2017-0100 [in English].

29. Vimonish, R., Johnson, W. C., Mousel, M. R., Brayton, K. A., Scoles, G. A., Noh, S. M., & Ueti, M. W. (2020). Quantitative analysis of Anaplasma marginale acquisition and transmission by Dermacentor andersoni fed in vitro. *Scientific Reports,* 10, 470. https://doi.org/10.1038/s41598-019-57390-y [in English].

30. Voigt, W. P., Young, A. S., Mwaura, S. N., Nyaga, S. G., Njihia, G. M., Mwakima, F. N., & Morzaria, S. P. (1993). In vitro feeding of instars of the ixodid tick Amblyomma variegatum on skin membranes and its application to the transmission of Theileria mutans and Cowdria ruminantium. *Parasitology,* 107(3), 257–263. https://doi.org/10.1017/S0031182000079233 [in English].

Стаття поширюється на умовах ліцензії відкритого доступу CC BY 4.0

Дата першого надходження статті до видання: 30.07.2026
Дата прийняття статті до друку після рецензування: 15.09.2026
Дата публікації (оприлюднення) статті: 30.10.2026