

**СПОСОБНОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ (ACARI: IXODIDAE)  
РАЗНЫХ ВИДОВ ПОДДЕРЖИВАТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА  
КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

© **О. А. Белова**<sup>1, 2\*</sup> **И. С. Холодилов**<sup>1</sup> **А. Г. Литов**<sup>1, 3</sup>  
**Г. Г. Карганова**<sup>1, 4</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН поселение Московский, пос. Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1, Москва, 108819

<sup>2</sup> Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) ул. Малая Пироговская, 20, Москва, 119435

<sup>3</sup> МГУ им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет Воробьевы горы, 1, стр. 12, Москва, 119234

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) ул. Трубецкая, 8, стр. 2, Москва, 119991

\* E-mail: mikasusha@bk.ru

Поступила 02.12.2017

Работа посвящена изучению динамики репродукции и фенотипических изменений вирусной популяции вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) при долгосрочной инфекции, питании иксодовых клещей и при разных температурных условиях. Было показано, что температура окружающей среды оказывает существенное влияние на уровень репродукции ВКЭ в голодных иксодовых клещах. Однако при питании клещей происходит достоверно более быстрая и интенсивная репродукция ВКЭ по сравнению с зараженными клещами, содержащимися при повышенной (32—37 °С) и комнатной температурах.

Штаммы ВКЭ европейского и сибирского подтипа успешно размножались и на протяжении длительного периода сохранялись в клещах, являющихся как основными (*Ixodes ricinus*, *I. persulcatus*), так и второстепенными (*Dermacentor reticulatus*) переносчиками вируса. Наибольших титров штамм сибирского подтипа достигал в клещах *D. reticulatus*, а штамм европейского подтипа — в клещах *Ixodes ricinus* и *D. reticulatus*. Длительная репродукция ВКЭ европейского и сибирского подтипов в организме клещей, являющихся основными и второстепенными переносчиками, повышала гетерогенность вирусной популяции, однако варианты вируса сохраняли высокую нейтроинвазивность, характерную для вируса, адаптированного к клеткам ЦНС мыши. Штаммы ВКЭ разных подтипов различались по фенотипической гетерогенности популяции в разных условиях. В отличие от штамма Абсеттаров (европейский

подтип) на гетерогенность вирусной популяции штамма ЭК-328 (сибирский подтип) по фенотипу бляшек на культуре клеток СПЭВ значительно повлияло питание клещей *D. reticulatus* после долгосрочной репродукции в них вируса.

*Ключевые слова:* иксодовые клещи, *Ixodes*, *Dermacentor*, вирус клещевого энцефалита, гетерогенность популяции, длительная репродукция вируса, питание клещей.

Иксодовые клещи — это высокоспециализированные паразиты позвоночных животных (Балашов, 1998). В процессе эволюции клещи выработали ряд приспособлений для успешного завершения жизненного цикла в зависимости от особенностей хозяина и условий изменяющегося климата. В силу своих биологических и экологических особенностей иксодовые клещи являются переносчиками различных вирусов, бактерий и простейших, многие из которых являются возбудителями различных заболеваний позвоночных животных. Одним из наиболее важных, с точки зрения вызываемых последствий, заболеваний является клещевой энцефалит (КЭ). Это природноочаговая трансмиссивная вирусная инфекция, возбудителем которой является нейротропный вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) рода *Flavivirus* (Flaviviridae). Основными переносчиками ВКЭ служат в первую очередь клещи *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) и *I. ricinus* (L., 1758), которые в сформировавшейся трехчленной паразитарной системе играют роль как переносчика, так и резервуара возбудителей инфекций. В связи с этим ВКЭ для успешной циркуляции необходимо преодолевать кишечный барьер и иметь адаптации к защитным реакциям организма клеща, сильным перепадам температуры и таким физиологическим процессам, как питание, линька и диапауза. В результате иксодовые клещи определяют уровень циркуляции ВКЭ в природе и оказывают влияние на генетические и фенотипические свойства вирусной популяции.

Вопросу об особенностях репродукции ВКЭ в иксодовых клещах разных видов посвящено множество работ, в которых исследовались следующие аспекты проблемы.

1. Размножение вируса в клещах при питании (Бенда, 1958; Коренберг, Пчелкина, 1984; Khasnatinov et al., 2009; Belova et al., 2012; Slovák et al., 2014).

2. Размножение ВКЭ в напитавшихся личинках и нимфах клещей *I. ricinus*, развивающихся в различных температурных и фотопериодических условиях (Мишаева, Ерофеева, 1979).

3. Распространение вируса в зараженных голодных и напитавшихся клещах с помощью гистологических методов (Rajcani et al., 1976; Стефуткина, 1989).

4. Динамика репродукции вируса в клещах (Чунихин, Куренков, 1980; Kozuch, Nosek, 1980, 1985; Nosek et al., 1986; Slovák et al., 2014), эксплантах различных тканей клещей (Nosek et al., 1986; Стефуткина, 1989) и клетках клещей (Lawrie et al., 2004; Senigl et al., 2004, 2006; Ruzek et al., 2008; Belova et al., 2017).

5. Фенотипические и генетические свойства ВКЭ при пассировании в клещах *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 (Чунихин и др., 1979; Дживанян и др., 1986, 1988, 1991; Romanova et al., 2007) и клещах других видов (Belova et al., 2017).

Для клещей *Ixodes persulcatus* было показано, что ВКЭ сохраняется на протяжении 3 генераций при их культивировании и репродуцируется в клещах до высоких уровней (7—9 lgLD50) (Мишаева, Вотяков, 1982). Несмотря на обилие данных об особенностях репродукции ВКЭ в клещах, остается малоизученным вопрос об изменении состава популяции ВКЭ в иксодовых клещах при долгосрочной инфекции и в процессе питания — наиболее эпидемиологически важном этапе в жизненном цикле клеща и вируса, а также в голодных иксодидах при их содержании при разных температурных условиях.

Цель данной работы — изучить динамику репродукции и проанализировать фенотипические изменения вирусной популяции ВКЭ при долгосрочной инфекции, питании иксодовых клещей и при разных температурных условиях.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культура клеток млекопитающих. Перевиваемую культуру клеток почк эмбриона свиньи (СПЭВ) поддерживали при температуре 37 °С, как описано ранее (Romanova et al., 2007). В качестве ростовой среды использовалась смесь среды 199 на растворе Хенкса и среды 199 на растворе Эрла (2 : 1) (ФГУП «ПИПВЭ им. М. П. Чумакова РАМН»), содержащую 5 % фетальной телячьей сыворотки (Gibco).

Вирус. В работе использовали штаммы и варианты ВКЭ из лабораторной коллекции: 1) штамм Абсеттаров (GenBank: AF091005.1; Kozlovskaya et al., 2010) европейского подтипа, выделенный от больного человека в Ленинградской обл., где в период выделения вируса в основном встречался *I. ricinus*; 2) штамм ЭК-328 (GenBank: DQ486861.1; Romanova et al., 2007) сибирского подтипа, первоначально выделенный из пула клещей *I. persulcatus* в 1972 г. в Эстонии (зона симпатрии таежного и лесного клещей).

Животные. Для кормления клещей в работе были использованы беспородные (б/п) белые мыши 22—24 г (ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, филиал «Андреевка») и кролики (порода советская шиншилла, ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, филиал «Электрогорский»). Для анализа нейроинвазивности ВКЭ использовали мышей линии BALB/c 16—18 г (ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, филиал «Столбовая»).

Содержание и кормление клещей на лабораторных животных. В работе использовали лабораторные культуры клещей *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* Fabricius, 1794 (исходные самки из Калужской обл.), а также клещей *I. persulcatus* (исходные самки из Республики Карелия). В опытах использовали активных половозрелых особей через 2—3 мес. после их линьки из нимф. Исходные самки клещей, давшие начало лабораторным культурам, были проверены на отсутствие зараженности 4 инфекциями с помощью набора на основе ПЦР в реальном времени (ИнтерЛабСервис, АмплиСенс® TBEV, *Borrelia burgdorferi* s. l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*/*E. muris* — FL). В лабораторных условиях клещей содержали в пробирках дифференцированной влажности (Нельзина, 1950). Кормление клещей проводили по стандартной методике, описанной ранее (Белова и др., 2015; Belova et al., 2017).

Заражение иксодовых клещей. Заражение проводили перкоксальным методом согласно методике, описанной ранее (Belova et al., 2012).

Титрование вируса методом бляшек. Титры вируса определяли методом бляшек под агаровым покрытием в культуре клеток СПЭВ на пластиковых 6-луночных планшетах согласно описанной методике (Belova et al., 2012). Титр вируса выражали в виде десятичного логарифма количества бляшкообразующих единиц (lgБОЕ) в 1%-ной клещевой суспензии — при анализе клещей, или в 1 мл вирусосодержащего материала — при исследовании культуральной жидкости (КЖ) инфицированных клеток или суспензии мозга инфицированных мышей.

Титрование ВКЭ на мышах. Для определения титров инфекционного вируса на мышах линии BALB/c весом 16—18 г готовили десятикратные разведения вирусосодержащего материала (КЖ или клещевые суспензии) в среде 199 на растворе Эрла (ФГУП «ПИПВЭ им. М. П. Чумакова РАМН») и вводили материал по 0.3 мл интраперитонеально (i/p). Каждым разведением вируса заражали 5 животных. Ежедневно и на протяжении 21 дня учитывали общее состояние животных. Титр вируса рассчитывали по методу Кербера и выражали в летальных дозах ( $LD_{50}$ ) — доза, вызывающая поражение 50 % мышей (Lorenz, Vogel, 1973). Нейроинвазивность штаммов оценивали по количеству БОЕ вируса, которое соответствует 1  $LD_{50}$  для мышей.

Размножение ВКЭ в зараженных клещах *I. ricinus* при питании и разной температуре окружающей среды. Самок и самцов клещей *I. ricinus* из лабораторной культуры заражали перкоксально ВКЭ штаммом Абсеттаров в дозе 3.3—3.6 lgБОЕ/клещ. Затем зараженных клещей разбивали на 3 группы. Первую группу клещей оставили в пробирках при комнатной температуре (23 °C), вторую поместили в термостат при 37 °C (имитация температуры поверхности тела прокормителя), третью группу клещей для питания подсадили на кролика. Через 6, 12, 18, 24, 48, 72 ч и 4, 7, 9 дней после заражения из каждой группы отбирали по 5—7 клещей (из группы питающихся клещей — по 2—3 особи) и замораживали при –70 °C до проведения вирусологических исследований.

В связи с высокой активностью и смертностью голодных клещей из группы, находящейся в термостате при 37 °C, по прошествии 24 ч после заражения температуру содержания для данной группы снизили до 32 °C, так как при данной температуре активность и смертность клещей заметно снизилась, но она по-прежнему осталась повышенной и подходила для имитации температуры поверхности тела прокормителя.

Долгосрочная инфекция ВКЭ клещей разных видов. Для получения долгосрочной инфекции ВКЭ половозрелых клещей *I. ricinus*, *I. persulcatus* и *D. reticulatus* заражали перкоксально штаммом ЭК-328 или Абсеттаров. Каждым штаммом заражали по 30 самок и 30 самцов *I. ricinus* и *I. persulcatus* (доза вируса 4.4—4.7 lgБОЕ/клещ) и по 90 самок и 50 самцов *D. reticulatus* (доза вируса 4.7—4.9 lgБОЕ/клещ). После инъекции вируса клещей содержали в пробирках дифференцированной влажности при комнатной температуре. В течение 146 сут (период наблюдения) за клещами наблюдали, фиксировали смертность и на разные временные точки отбирали и замораживали при –70 °C по 2—5 особей для дальнейшего вирусологического анализа.

Для контроля смертности клещей в эксперименте использовали 2 контрольные группы. Особям одной из них перкоксально вводили КЖ незараженных клеток СПЭВ, а клещи из другой группы оставались интактными. Данных клещей также содержали в пробирках дифференцированной влажности и наблюдали за ними в течение 146 сут (период наблюдения).

У клещей *I. persulcatus* как в зараженной, так и в контрольных группах, мы отмечаем высокую смертность особей. В связи с этим наблюдения за клещами данного вида были прекращены после 54 сут с момента заражения.

Для анализа поведения вируса в питающихся клещах после длительной репродукции на 128-е сут после заражения были отобраны для каждого штамма ВКЭ по 10 самок и 5 самцов *D. reticulatus* и подсажены на кролика для питания. Через 30, 104 ч и 7 дней после начала питания с кролика снимали и замораживали по 2—3 самки клещей до дальнейшего вирусологического исследования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что при естественном заражении иксодид ВКЭ в процессе питания на зараженном хозяине первичным местом репликации вируса являются клетки средней кишки клещей (Rajcani et al., 1976; Стефуткина, 1989). Способность вируса преодолевать кишечный барьер является одним из условий, определяющих компетентность клещей как переносчиков ВКЭ (Nuttall et al., 1994). В настоящей работе заражение ВКЭ клещей *I. ricinus*, *I. persulcatus* и *D. reticulatus*, которые являются основными и второстепенными (*D. reticulatus*) переносчиками ВКЭ, проводилось перкоксальным методом, позволяющим инокулировать вирус непосредственно в гемоцель клеща, минуя кишечный барьер. Данный метод заражения клещей вирусом отличается от естественного, однако он позволяет заразить клеща определенной дозой вируса со 100%-ной эффективностью, и при этом сам клещ остается в голодном состоянии, что необходимо при изучении долгосрочной репродукции ВКЭ в организме клеща.

### Размножение ВКЭ в зараженных клещах *I. ricinus* при питании и разной температуре окружающей среды

В данной работе мы сравнили динамику репродукции ВКЭ штамма Абсеттаров европейского генотипа в голодных клещах *I. ricinus* при комнатной и повышенной (32—37 °С) температурах, а также в клещах, питающихся на кролике. Согласно полученным данным (рис. 1), ВКЭ размножался достоверно быстрее и достигал наиболее высоких титров как в клещах при питании, так и в голодных клещах, содержащихся при повышенной температуре (32—37 °С), по сравнению с голодными клещами, находящимися при комнатной температуре.

В питающихся клещах начало роста титров вируса и достижение 3 IgБОВЕ/клещ произошло на 6 ч раньше, чем в голодных клещах, содер-

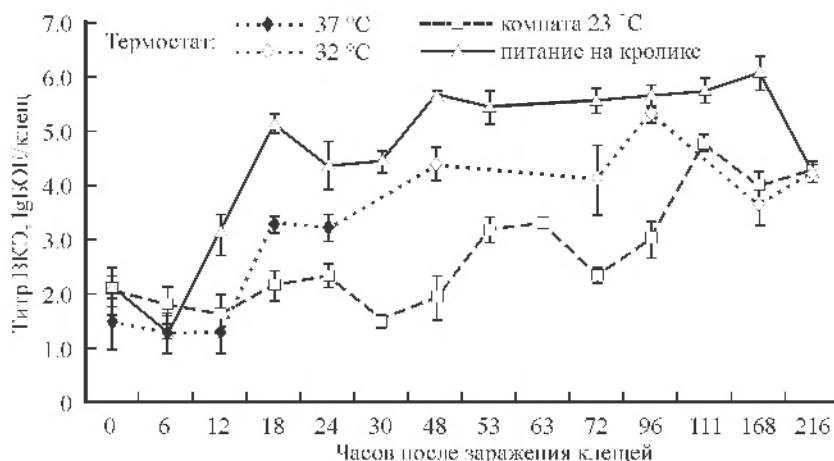


Рис. 1. Динамика размножения штамма Абсеттаров ВКЭ в голодных клещах *Ixodes ricinus* при комнатной температуре, в термостате при 32—37°C, а также в клещах, питающихся на кролике.

Fig. 1. Dynamics of reproduction of the TBEV strain Absettarov in hungry *Ixodes ricinus* ticks at room temperature, in a thermostat at the 32—37°C, and in ticks feeding on rabbit.

жащихся при температуре 37 °C. В голодных клещах, находящихся при комнатной температуре, вирус достиг упомянутого титра только к 4-м сут после заражения. Практически на всем протяжении наблюдений титры ВКЭ в питающихся клещах были достоверно более высокие ( $p < 0.05$ ).

Спустя 216 ч питания зараженных иксодид на кролике произошло отпадение клещей. Титр ВКЭ в отпавших клещах заметно снизился и стал одинаковым с титром вируса в голодных клещах, содержащихся при повышенной и комнатной температуре. Известно, что первую порцию инфицированной слюны клещ выделяет уже в первые минуты кровососания (Чунихин и др., 1988), и при попадании в прокормителя вирус проникает и начинает размножаться в его клетках. Очевидно, поддержание высоких титров вируса в клещах при питании связано с дополнительным размножением ВКЭ в клетках прокормителя.

Ранее был проведен эксперимент по изучению размножения ВКЭ в напитавшихся личинках и нимфах клещей *I. ricinus*, развивающихся в различных температурных и фотопериодических условиях (Мишаева, Ерофеева, 1979). В данном эксперименте при исследовании личинок через 4 и 8 недель после питания на зараженном ВКЭ животном было показано, что титры вируса в клещах, содержащихся при 18 и 23 °C были выше, чем титры вируса в клещах, находящихся при 9 °C, т. е. было показано, что на репродукцию ВКЭ в напитавшихся личинках влияет температура их содержания. Согласно нашим данным, содержание зараженных ВКЭ голодных клещей в условиях повышенной температуры (37 °C) также приводит к более быстрому и интенсивному размножению вируса по сравнению с голодными клещами, содержащимися при комнатной температуре, однако эти изменения достоверно менее весомы, чем изменения репродукции вируса при питании зараженного клеща.

Полученные данные о существенном влиянии повышенной температуры окружающей среды на скорость репродукции ВКЭ в голодных клещах

очень важны с эпизоотологической точки зрения, так как, возможно, уровень вирусной нагрузки в иксодовых клещах в природном очаге КЭ может также зависеть от температурных условий и в особо жаркий весенне-летний сезон будет наиболее высоким.

Фенотип бляшек, которые образует ВКЭ на культуре клеток СПЭВ под агаровым покрытием, практически на всем протяжении периода наблюдения не менялся во всех экспериментальных группах. Единственное явное проявление гетерогенности популяции ВКЭ наблюдалось в самцах *I. ricinus*, находившихся в термостате 2 сут после заражения вирусом (соотношение бляшек  $10 : 5 : 2.5 \text{ мм} = 1 : 1 : 1$  и  $10 : 5 \text{ мм} = 1 : 1$ ).

Таким образом, повышение температуры окружающей среды приводит к увеличению скорости репликации вируса в клещах. Однако уже после 6 ч питания клещей *I. ricinus* происходит более быстрое и интенсивное размножение вируса по сравнению с голодными клещами, содержащимися как при комнатной, так и при повышенной температуре. Гетерогенность популяции ВКЭ по размеру бляшек, образуемых на культуре клеток СПЭВ, наблюдалось только на вторые сутки после заражения в клещах, находившихся в термостате.

#### Долгосрочная инфекция ВКЭ клещей разных видов

В активных природных очагах КЭ вирусу приходится длительное время пребывать в организме зараженного клеща в связи с особенностями физиологии, поведения и сезонного хода активности переносчика. Описанный выше эксперимент проводился с клещами сразу после их заражения ВКЭ, из-за чего, вероятно, мы не наблюдали явного проявления гетерогенности вирусной популяции. В последующих опытах мы попытались получить адаптированные к клещам варианты с длительной репродукцией в их организме. Для этого мы заражали перкоксально клещей *I. ricinus*, *I. persulcatus* и *D. reticulatus* из лабораторных культур штаммами ЭК-328 (сибирский подтип) и Абсеттаров (европейский подтип) ВКЭ. В разные сроки после инфекции в течение 5 мес. мы отбирали несколько особей каждого вида и определяли титр ВКЭ в клещевых суспензиях методом бляшек. Для клещей *I. persulcatus* период наблюдения составил 54 дня в связи с их высокой смертностью в лабораторных условиях.

Динамика репродукции штамма ЭК-328 в *I. ricinus*, *I. persulcatus* и *D. reticulatus* описана ранее (Belova et al., 2017). Согласно полученным данным, оба штамма ВКЭ успешно размножались и были способны длительно сохраняться во всех 3 видах клещей (рис. 2). Вопреки нашим ожиданиям, самые высокие титры штамма ЭК-328 наблюдались в клещах *D. reticulatus* в течение всего периода наблюдения (рис. 2, А). Штамм Абсеттаров достиг наивысших титров в клещах *I. ricinus*, однако на 4 и 14 дни после инфекции количество инфекционного вируса было достоверно выше в клещах *D. reticulatus* (рис. 2, Б).

Даже на более поздних сроках после инфекции ситуация не изменилась: в клещах *D. reticulatus* титр ЭК-328 сохранился на уровне не ниже 4 IgБОЕ, а титр штамма Абсеттаров, хотя в целом и снизился, в некоторых

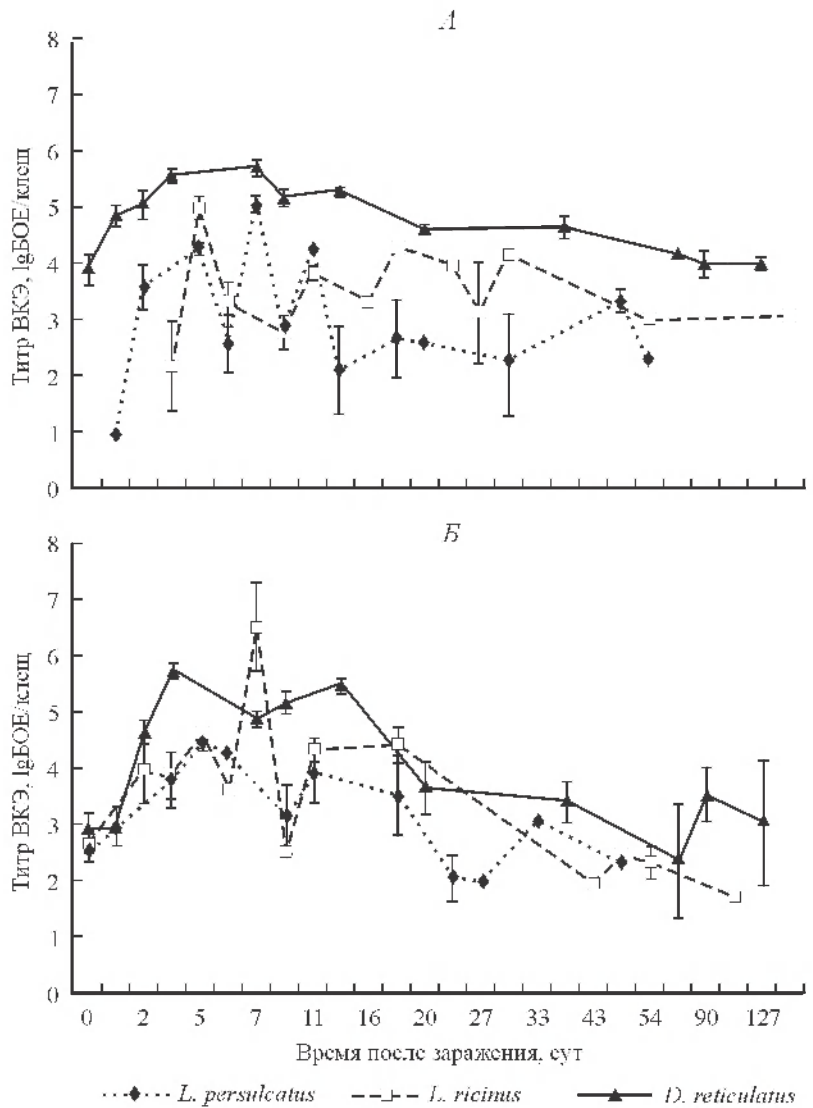


Рис. 2. Динамика размножения ВКЭ при долгосрочной инфекции клещей *Ixodes ricinus*, *I. persulcatus* и *Dermacentor reticulatus*.

А — для штамма ЭК-328 (Belova et al., 2017), Б — для штамма Абсеттаров.

Fig. 2. Dynamics of the TBEV reproduction during long-term infection of *Ixodes ricinus*, *I. persulcatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks.

точках был выше, чем в клещах рода *Ixodes*. Кривые репродукции вируса в клещах *I. ricinus* и *I. persulcatus* были в целом сходны, но на более отдаленных сроках репродукция обоих штаммов ВКЭ была ниже в клещах *I. persulcatus*.

Для оценки возможного изменения характеристик вируса, длительное время размножающегося в нехарактерном для него переносчике, 12 клещей *D. reticulatus* на 128-й день после заражения ВКЭ сажали на кроликов для питания (рис. 3). Штамм ЭК-328 активнее размножался в питающихся



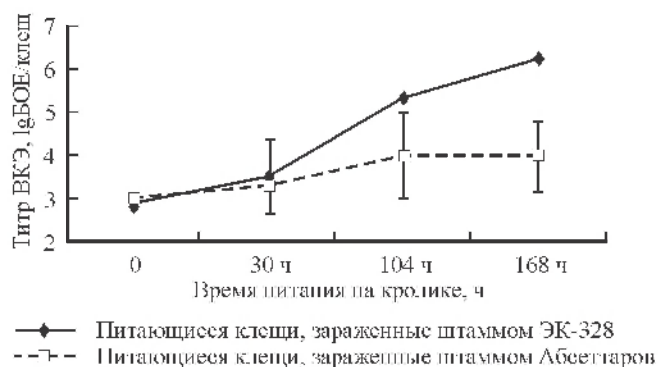


Рис. 3. Динамика размножения штаммов ЭК-328 и Абсетаров ВКЭ, персистирующих в клещах *Dermacentor reticulatus*, при питании на кролике.

Fig. 3. Dynamics of reproduction of the TBEV strains EK-328 and Absetarov, persisting in *Dermacentor reticulatus* ticks during feeding on rabbit.

клещах, чем штамм Абсетаров. К 7 дню питания титр штамма ЭК-328 в клещах достиг  $6.3 \pm 0.03$  lgBOE/клещ, что достоверно выше титра штамма Абсетаров на этот же срок —  $4.0 \pm 0.8$  lgBOE/клещ.

При анализе фенотипа бляшек штамма ЭК-328 при адаптации к долгосрочной инфекции в клещах мы наблюдали проявление гетерогенности вирусной популяции только на поздние сроки после заражения. Так, варианты т12732 и т12736, полученные из голодных и питающихся клещей *D. reticulatus*, на самых поздних сроках образовывали под агаровым покрытием на культуре клеток СПЭВ помимо стандартных для штамма ЭК-328 бляшек диаметром 8—10 мм также бляшки размером 2.5 и 1 мм соответственно в соотношении 1 : 1 (табл. 1). На более ранних сроках (14—15 сут) ВКЭ из клещей *D. reticulatus* и *I. ricinus* своих фенотипических свойств не изменил и образовывал только крупные бляшки. Интересно, что после 18 сут репродукции в клещах *I. persulcatus* проявилась гетерогенность вирусной популяции (вариант т11516) и наряду с крупными бляшками были отмечены точечные бледные бляшки в примерном соотношении 1 : 25, а у варианта, пребывавшего в клеще этого же вида 48 сут (вариант т11526), гетерогенности бляшек мы не наблюдали. Аналогичное наблюдение было сделано для варианта т12704, полученного после репродукции на протяжении 128 сут в голодных и 7 сут в питающихся клещах *D. reticulatus*. Данный вариант образовывал только крупные бляшки в культуре клеток СПЭВ. Данное явление, вероятно, связано с затрудненным учетом мелких бляшек при явном преобладании крупно бляшечных вариантов (например, более 50 : 1). Процесс питания клещей *D. reticulatus*, по-видимому, повлиял на гетерогенность вирусной популяции — почти все варианты из питающихся клещей помимо крупных бляшек, характерных для исходного штамма (8—10 мм), образовывали мелкие бляшки диаметром 2.5—4 мм, 1 мм и даже точечные.

В отличие от штамма ЭК-328 адаптанты штамма Абсетаров образовывали бляшки разного размера в культуре клеток СПЭВ уже после 10 сут пребывания в клещах (табл. 2). Если для исходного штамма Абсетаров характерны яркие бляшки диаметром 7—10 мм, то после 10 дней пребыва-

Таблица 1

Свойства вариантов штамма ЭК-328 ВКЭ, адаптированных к долгосрочной репродукции в клещах разных видов

Table 1. Properties of the variants of the TBEV strain EK-328, adapted to the long-term reproduction in ticks of different species

Номер варианта	Пассажная история	Титр ВКЭ, IgБОЕ/мл	Размер бляшек, мм <sup>1</sup>
—	Исходный штамм ЭК-328 в виде КЖ клеток СПЭВ	7.3 ± 0.3 (n = 10)	8—10
т11428	15 сут в голодном <i>I. ricinus</i>	2.7	8—10
т11424	146 сут в голодном <i>I. ricinus</i>	3	8—10
т11516	18 сут в голодном <i>I. persulcatus</i>	3.2	(7—8) мм : тчк = 1 : 25
т11521	31 сут в голодном <i>I. persulcatus</i>	3.1	(8—10) : 2.5 мм = 4 : 1
т11526	48 сут в голодном <i>I. persulcatus</i>	3.2	8—10
т12718	14 сут в голодном <i>D. reticulatus</i>	4.1	7—8
т12546	40 сут в голодном <i>D. reticulatus</i>	5.3	8—10
т12732	128 сут в голодном <i>D. reticulatus</i>	3.2	8 : 1 мм = 1 : 1
т12579	135 сут в голодном <i>D. reticulatus</i>	2.7	3—4
т12705	143 сут в голодном <i>D. reticulatus</i>	3.5	3—4
т12733	128 сут в голодном и 30 ч в питающемся <i>D. reticulatus</i>	4.6	(4—5) мм : тчк = 7 : 1
т12734	128 сут в голодном и 30 ч в питающемся <i>D. reticulatus</i>	2.75	(7—8) : 1 мм = 11 : 1
т12735	128 сут в голодном и 104 ч в питающемся <i>D. reticulatus</i>	5.5	3—4
т12736	128 сут в голодном и 104 ч в питающемся <i>D. reticulatus</i>	5.4	7 : 2.5 мм = 1 : 1
т12704	128 сут в голодном и 7 сут в питающемся <i>D. reticulatus</i>	6.3	8—10

Примечание. <sup>1</sup> — размер бляшек оценивали на 7-й день после заражения культуры клеток СПЭВ; n — количество проделанных независимых экспериментов.

ния вируса в исходных клещах разных видов прослеживалась тенденция уменьшения диаметра и появления точечных бляшек. Варианты, адаптированные к долгосрочной репродукции в клещах *I. ricinus* и *I. persulcatus*, образовывали в культуре клеток СПЭВ смесь бляшек диаметром 3—5 мм и точечных примерно в равном соотношении. Для вариантов, адаптированных к *D. reticulatus*, было характерно образование смеси бляшек 2—3 и 6—7 мм. Появление точечных бляшек мы наблюдали только у одного варианта (т12797) после 143 сут пребывания вируса в голодном *D. reticulatus*. Варианты ВКЭ, выделенные из питающихся клещей *D. reticulatus*, образовывали сходные с вариантами из голодных клещей бляшки в похожем соотношении.

Таким образом, оба штамма ВКЭ успешно размножились и длительное время сохранялись в клещах *I. ricinus*, *I. persulcatus* и *D. reticulatus*. Штамм ЭК-328 достигал наиболее высоких титров в клещах *D. reticulatus*, а штамм Абсеттаров — в *I. ricinus* и *D. reticulatus*. Гетерогенность бляшек, которые образовывали варианты в культуре клеток СПЭВ под агаровым покрытием, была характерна для обоих штаммов при адаптации к долгосрочной репродукции в клещах разных видов. Фенотип бляшек штамма

Таблица 2

Свойства вариантов штамма Абсеттаров ВКЭ, адаптированных к долгосрочной репродукции в клещах разных видов

Table 2. Properties of the variants of the TBEV strain Absettarov, adapted to the long-term reproduction in ticks of different species

Номер варианта	Пассажная история	Титр ВКЭ, lgБОЕ/мл	Размер бляшек, мм <sup>1</sup>
2641	Исходный штамм Абсеттаров в виде КЖ клеток СПЭВ	7.4	7—10
т11402	10 сут в голодном <i>I. ricinus</i>	2.2	(4—5) мм : тчк = 6 : 1
т11407	48 сут в голодном <i>I. ricinus</i>	2.4	(4—5) мм : тчк = 1 : 8
т11388	54 сут в голодном <i>I. ricinus</i>	3.3	4—5
т11398	116 сут в голодном <i>I. ricinus</i>	1.6	(2—4) мм : 1 мм: тчк = = 3 : 1 : 1
т11506	10 сут в голодном <i>I. persulcatus</i>	3.7	(2.5—4) мм: 1 мм: тчк = = 1 : 1 : 1
т11498	31 сут в голодном <i>I. persulcatus</i>	3.3	(4—5) мм : тчк = 1 : 1
т11512	33 сут в голодном <i>I. persulcatus</i>	3	(1.5—3.5) мм : тчк = 1 : 1
т11503	48 сут в голодном <i>I. persulcatus</i>	2.3	(4—5) мм : тчк = 5 : 1
т12787	14 сут в голодном <i>D. reticulatus</i>	4.9	3—5
т12888	40 сут в голодном <i>D. reticulatus</i>	4.2	(6—7) : 3 мм = 5 : 1
т12796	135 сут в голодном <i>D. reticulatus</i>	4.0	7 : 1 мм = 1 : 1
т12797	143 сут в голодном <i>D. reticulatus</i>	4.1	7 : 4 : 1: тчк мм = = 1 : 20 : 7 : 5
т12770	128 сут в голодных + 30 ч в питающихся <i>D. reticulatus</i>	3.6	(5—7) : 3 мм = 8 : 1
т12772	128 сут в голодных + 104 ч в питающихся <i>D. reticulatus</i>	3.3	(6—8) : (1.5—2) : 1 мм = = 8 : 1 : 5
т12773	128 суток в голодных + 7 сут в питающихся <i>D. reticulatus</i>	3.3	6 : 2 мм = 3 : 1
т12774	128 сут в голодных + 7 сут в питающихся <i>D. reticulatus</i>	5.3	(6—7) : 2 мм = 20 : 1

Примечание. <sup>1</sup> — размер бляшек оценивали на 7-й день после заражения культуры клеток СПЭВ.

Абсеттаров изменился уже после 10 дней пребывания в иксодидах, тогда как гетерогенность вирусной популяции штамма ЭК-328 была заметна в основном только на наиболее отдаленных сроках после инфицирования клещей (от 90 сут). Питание клещей *D. reticulatus* после долгосрочной репродукции в них штамма ЭК-328 значительно повлияло на гетерогенность вирусной популяции по бляшкам на культуре клеток СПЭВ, что не было характерно для аналогичных вариантов штамма Абсеттаров.

Ранее для некоторых вариантов штамма ЭК-328, полученных при долгосрочной репродукции в клещах *I. ricinus*, *I. persulcatus* и *D. reticulatus*, мы оценили нейроинвазивность для лабораторных мышей при интраперитонеальном введении вируса (Belova et al., 2017). Несмотря на то что для заражения клещей был использован штамм ЭК-328 в виде КЖ инфицированных клеток СПЭВ (1 ЛД<sub>50</sub> ~ 1.7 ± 0.3 lgБОЕ), все исследованные варианты, полученные при долгосрочной инфекции клещей, обладали повышенной нейроинвазивностью (1 ЛД<sub>50</sub> ~ (0.3—0.8) lgБОЕ), сходной с та-

ковой штамма ЭК-328, полученного при размножении в мозге мышей (1 ЛД<sub>50</sub> ~ 0.7 ± 0.6 lgБОЕ). Наиболее низкой нейроинвазивностью для мышей обладал вариант, выделенный из питавшегося клеща *D. reticulatus* (1 ЛД<sub>50</sub> ~ 1.2 lgБОЕ), однако разница статистически недостоверна.

Представленные данные показывают, что длительная репродукция ВКЭ европейского и сибирского подтипов в организме клещей, являющихся основными и второстепенными переносчиками, повышает гетерогенность вирусной популяции. Однако варианты вируса сохраняют высокую нейроинвазивность, характерную для исходного адаптированного к клеткам ЦНС вируса. Ранее было показано, что при адаптации ВКЭ к острой инфекции в клещах разных видов путем последовательных пассажей происходит отбор вариантов со сниженной нейроинвазивностью для мышей (Дживанян и др., 1988; Romanova et al., 2007; Belova et al., 2017). Вероятно, при формировании долгосрочной инфекции в иксодовых клещах отбор подобных вариантов не происходит или происходит гораздо медленнее.

### ВЫВОДЫ

В ходе работы были получены следующие результаты.

1. Температура окружающей среды оказывает существенное влияние на уровень репродукции ВКЭ в иксодовых клещах. Вероятно, вирусная нагрузка в клещах в природных очагах КЭ может также зависеть от климатических условий.

2. При питании клещей происходит более быстрая и интенсивная репродукция ВКЭ по сравнению с репродукцией вируса в зараженных голодных клещах, содержащихся при повышенной (32—37 °С) и комнатной температуре.

3. Оба штамма ВКЭ европейского и сибирского подтипа успешно размножались и длительное время сохранялись в клещах, являющихся как основными (*I. ricinus*, *I. persulcatus*), так и второстепенными (*D. reticulatus*) переносчиками вируса. Наибольших титров штамм сибирского подтипа достигал в клещах *D. reticulatus*, а штамм европейского подтипа — в клещах *I. ricinus* и *D. reticulatus*.

4. Длительная репродукция ВКЭ европейского и сибирского подтипов в организме клещей, являющихся основными и второстепенными переносчиками, повышает гетерогенность вирусной популяции, однако варианты вируса сохраняют высокую нейроинвазивность, характерную для вируса, адаптированного к клеткам ЦНС мыши.

5. Штаммы ВКЭ разных подтипов различаются по фенотипической гетерогенности популяции в разных условиях. В отличие от штамма Абсеттаров на гетерогенность вирусной популяции штамма ЭК-328 по фенотипу бляшек на культуре клеток СПЭВ значительно повлияло питание клещей *D. reticulatus* после долгосрочной репродукции в них вируса.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Ю. В. Роговой за помощь в работе с культурой клещей СПЭВ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№ 15-14-00048).

## Список литературы

- Балашов Ю. С. 1998. Иксодовые клещи — паразиты и переносчики инфекций. СПб.: Наука. 285 с.
- Белова О. А., Холодильников И. С., Карганова Г. Г. 2015. Нейроинвазивность вариантов вируса клещевого энцефалита, адаптированных к иксодовым клещам. Современные проблемы науки и образования. 5; URL: <http://www.science-education.ru/128-21883>
- Бенда Р. (Benda R.). 1958. Обычный клещ *Ixodes ricinus* как резервуар вируса и переносчик клещевого энцефалита. II. Экспериментальная передача энцефалита лабораторным животным клещами на разных фазах их развития. Журнал гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии. Прага. 2: 467—480.
- Дживанян Т. И., Карганова Г. Г., Соболев С. Г., Королев М. Б., Каштанова Г. М., Чупринская М. В., Лашкевич В. А. 1991. Свойства частиц, формирующихся при воспроизведении острой инфекции *in vitro* вирусом клещевого энцефалита, адаптированным к клещам *H. plumbeum*. Вопросы вирусологии. 4: 297—300.
- Дживанян Т. И., Чунихин С. П., Лисак В. М., Каштанова Г. М., Королев М. Б. 1986. Иммунохимические характеристики антигенов варианта вируса клещевого энцефалита, адаптированного к клещам *Hyalomma plumbeum*. Вопросы вирусологии. 1: 92—96.
- Дживанян Т. И., Королев М. Б., Карганова Г. Г., Лисак В. М., Каштанова Г. М., Чупринская М. В. 1988. Изменение зависимых от хозяина характеристик вируса клещевого энцефалита при его адаптации к клещам и реадaptации к белым мышам. Вопросы вирусологии. 5: 589—595.
- Коренберг Э. И., Пчелкина А. А. 1984. Титры вируса клещевого энцефалита у напивавшихся взрослых клещей *Ixodes persulcatus*. Паразитология. 28 (2): 123—127.
- Мишаева Н. П., Ерофеева Н. И. 1979. Влияние диапаузы клеща *Ixodes ricinus* (Ixodidae) на размножение в его организме вируса клещевого энцефалита. Паразитология. 13 (3): 218—222.
- Мишаева Н. П., Вотяков В. И. 1982. Репродуктивный баланс вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах и позвоночных животных в условиях иммунологической перестройки организма хозяина к антигенам слюны членистоногих. Экология вирусов. М. 40—45.
- Нельзина Е. Н. 1950. Крысинный клещ. М.: Изд-во АМН СССР. 100 с.
- Стефуткина Л. Ф. 1989. Морфологические и вирусологические особенности инфекции вирусом клещевого энцефалита клеток и тканей иксодовых клещей. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М. 21 с.
- Чунихин С. П., Куренков В. Б. 1980. Изучение динамики репродукции вируса клещевого энцефалита в клещах *Hyalomma plumbeum*. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. XLIX (2): 25—27.
- Чунихин С. П., Куренков В. Б., Дживанян Т. И., Рыльцева Е. В. 1979. Изучение особенностей трансфазовой и трансмиссивной передачи штаммов вируса клещевого энцефалита с разной степенью патогенности для мышей. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2: 61—65.
- Чунихин С. П., Алексеев А. Н., Решетников И. А. 1988. Определение дозы вируса клещевого энцефалита в слюне голодных иксодовых клещей. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 3: 89—91.

- Belova O. A., Burenkova A., Karganova G. G. 2012. Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially engorged ixodid ticks — Evidence of virus replication and changes in tick behavior. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 3: 240—246.
- Belova O. A., Litov A. G., Kholodilov I. S., Kozlovskaya L. I., Bell-Sakyi L., Romanova L. Iu., Karganova G. G. 2017. Properties of the tick-borne encephalitis virus population during persistent infection of ixodid ticks and tick cell lines. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 8 (6): 895—906.
- Khasnatinov M. A., Ustanikova K., Frolova T. V., Pogodina V. V., Bochkova N. G., Levina L. S., Slovak M., Kazimirova M., Labuda M., Klempa B., Eleckova E., Gould E. A., Gritsun T. S. 2009. Non-hemagglutinating flaviviruses: molecular mechanisms for the emergence of new strains via adaptation to European ticks. *PLoS One*. 4 (10): e7295.
- Kozlovskaya L. I., Osolodkin D. I., Shevtsova A. S., Romanova L. Iu., Rogova Y. V., Dzhivaniyan T. I., Lyapustin V. N., Pivanova G. P., Gmyl A. P., Palyulin V. A., Karganova G. G. 2010. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 398 (2): 262—272.
- Kozuch O., Nosek J. 1980. Experimental transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Haemaphysalis concinna* ticks. *Acta Virologica*. 24 (5): 377.
- Lawrie C. H., Uzcátegui N. Y., Armesto M., Bell-Sakyi L., Gould E. A. 2004. Susceptibility of mosquito and tick cell lines to infection with various flaviviruses. *Medical and Veterinary Entomology*. 18 (3): 268—274.
- Lorenz R. J., Bogel K. 1973. Methods of calculation / In: Kaplan M. M., Koprowski H. (eds), *Laboratory techniques in rabies*, 3rd ed. World Health Organization, Geneva. 321—335.
- Nosek J., Chunikhin S. P., Gresiková M., Korolev M. B., Kozuch O., Stefutkina L. F., Ivannikova T. I. 1986. Peculiarities of tick-borne encephalitis virus reproduction in *Haemaphysalis inermis* ticks and their explants. *Acta Virologica*. 30 (5): 396—401.
- Nosek J., Kozuch O. 1985. Replication of tick-borne encephalitis (TBE) virus in ticks *Dermacentor marginatus*. *Angewandte Parasitologie*. 26 (2): 97—101.
- Nuttall P. A., Jones L. D., Labuda M., Kaufman W. R. 1994. Adaptations of arboviruses to ticks. *Journal of Medical Entomology*. 31 (1): 1—9.
- Rajcáni J., Nosek J., Kozuch O., Waltinger H. 1976. Reaction of the host to tick-bite. II. Distribution of tick borne encephalitis virus in sucking ticks. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. 1. Abt. Medizinisch-hygienische Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie. Originale. 236 (1): 1—9.
- Romanova L. Iu., Gmyl A. P., Dzhivaniyan T. I., Bakhmutov D. V., Lukashev A. N., Gmyl L. V., Rummyantsev A. A., Burenkova L. A., Lashkevich V. A., Karganova G. G. 2007. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology*. 36 (2): 75—84.
- Růžek D., Bell-Sakyi L., Kopecký J., Grubhoffer L. 2008. Growth of tick-borne encephalitis virus (European subtype) in cell lines from vector and non-vector ticks. *Virus Research*. 137 (1): 142—146.
- Senigl F., Grubhoffer L., Kopecký J. 2006. Differences in maturation of tick-borne encephalitis virus in mammalian and tick cell line. *Intervirology*. 49 (4): 239—248.
- Senigl F., Kopecký J., Grubhoffer L. 2004. Distribution of E and NS1 proteins of TBE virus in mammalian and tick cells. *Folia Microbiologica*. 49: 213—216.
- Slovak M., Kazimirová M., Siebenstichová M., Ustaniková K., Klempa B., Gritsun T., Gould E. A., Nuttall P. A. 2014. Survival dynamics of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 5 (6): 962—969.

ABILITY OF IXODID TICKS (ACARI: IXODIDAE) TO SUPPORT  
REPRODUCTION OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

O. A. Belova, I. S. Kholodilov, A. G. Litov, G. G. Karganova

*Key words:* ixodid ticks, tick-borne encephalitis virus, population heterogeneity, long-term reproduction, *Ixodes*, *Dermacentor*, feeding of ticks.

SUMMARY

The work is devoted to the study of the dynamics of reproduction and phenotypic changes in a population of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) during long-term infection, feeding of ixodid ticks, and under different temperature conditions. It was shown that the increased temperature significantly affected the level of TBEV reproduction in ixodid ticks. During ticks feeding, however, more rapid and intensive TBEV reproduction was observed in comparison with infected ticks kept at the increased (32—37°C) and room temperatures.

TBEV strains of the European and Siberian subtypes successfully replicated and formed long-term infection in ticks that were both primary (*Ixodes ricinus*, *I. persulcatus*) and secondary (*Dermacentor reticulatus*) virus vectors. The strain of the Siberian subtype reached its maximum titres in *D. reticulatus*, and the strain of the European subtype, in *I. ricinus* and *D. reticulatus* ticks. The long-term reproduction of the TBEV of the European and Siberian subtypes in ticks, both primary and secondary vectors, increased the heterogeneity of viral population, however, virus variants retained high neuroinvasiveness characteristic to the virus adapted to mouse CNS cells. The TBEV strains of different subtypes differed in the phenotypic heterogeneity of the population under different conditions. In contrast to the Absettarov (European subtype) strain, the heterogeneity of the virus population of EK-328 (Siberian subtype) strain on the phenotype of plaques on PEK cell culture was significantly influenced by feeding of *D. reticulatus* ticks after long-term reproduction of the virus in them.