

НЕЙРОИНВАЗИВНОСТЬ ВАРИАНТОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, АДАптиРОВАННЫХ К ИКСОДОВЫМ КЛЕЩАМ

Белова О.А.¹, Холодиллов И.С.¹, Карганова Г.Г.¹

¹Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Москва, Россия, e-mail: mikasusha@bk.ru

В данной работе мы сравнили нейроинвазивность вариантов вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), полученных при адаптации к иксодовым клещам: к одному из основных переносчиков ВКЭ *Ixodes ricinus* и к второстепенному переносчику *Dermacentor reticulatus*. Согласно полученным данным, репродукция ВКЭ в клещах – основных переносчиках может приводить к повышению нейроинвазивности вируса, что указывает на схожее первоначальное селективное воздействие клеток клещей и клеток ЦНС млекопитающих, несмотря на различные максимальные титры вируса в данных системах. Адаптация ВКЭ к клещам путем пассирования приводит к появлению в популяции вариантов, обладающих мелкоплазменным фенотипом в культуре клеток СПЭВ, и к снижению нейроинвазивности вируса. Данные изменения характерны для вирусной популяции, адаптированной как к основным, так и к второстепенным переносчикам ВКЭ.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, нейроинвазивность, адаптация, иксодовые клещи.

NEUROINVASIVENESS OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS VARIANTS ADAPTED TO THE IXODID TICKS

Belova O.A.¹, Kholodilov I.S.¹, Karganova G.G.¹

¹Federal State Budgetary Scientific Institution “Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis”, Moscow, Russia, e-mail: mikasusha@bk.ru

In this study we compared the neuroinvasiveness of the variants of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) obtained by adaptation to the ticks: to the one of the main vectors of TBEV *Ixodes ricinus* and to the secondary vector *Dermacentor reticulatus*. According to our data TBEV reproduction in the main-vector ticks may result in the increase of the virus neuroinvasiveness for white mice, indicating a similar initial selective impact of the tick cells and mammalian CNS cells in spite of the different maximum virus titers in these systems. Adaptation of TBEV to ticks through passages leads to the emergence of variants with the small-plaque phenotype in PEK cells, and to the decrease of the virus neuroinvasiveness. These changes are characteristic of the virus population, adapted to both primary and secondary TBEV vectors.

Keywords: tick-borne encephalitis virus, neuroinvasiveness, adaptation, ixodid ticks

Клещевой энцефалит (КЭ) – природноочаговая трансмиссивная вирусная инфекция, возбудителем которой является нейротропный вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) рода *Flavivirus* (сем. *Flaviviridae*). В большинстве случаев ВКЭ попадает в организм позвоночного животного при укусе зараженного вирусом иксодового клеща (*Acari: Ixodidae*), в первую очередь клещей *Ixodes persulcatus* и *I. ricinus*. В естественных позвоночных хозяевах инфекция, обычно, протекает бессимптомно. Для некоторых животных и для человека ВКЭ является патогенным и может вызывать поражение клеток ЦНС.

Одними из наиболее эпидемиологически значимых характеристик вируса являются его нейроинвазивность и нейровирулентность. Нейроинвазивность вируса отражает его способность проникать в ЦНС. Данное свойство вируса тесно связано с его способностью реплицироваться и распространяться в периферических тканях и достигать высокого уровня

виремии. Многочисленные исследования нейровирулентности и нейроинвазивности различных штаммов ВКЭ, выделенных от больных людей и клещей, показали, что штаммы значительно различаются по этим характеристикам. Поскольку ВКЭ является арбовирусом, естественно было бы предположить, что определенные характеристики биоценоза, в первую очередь, вид и физиологическое состояние клеща определяют свойства вирусной популяции.

Разными учеными было показано, что адаптация ВКЭ к различным системам (клещи, культуры клеток) путем последовательных пассажей приводит к изменению его свойств, в частности, нейроинвазивности и фенотипа бляшек, образуемых в культуре клеток почек эмбрионов свиньи под агаровым покрытием [1; 9; 11; 12]. Ранее при адаптации штамма ЭК-328 ВКЭ (сибирский генотип), первоначально выделенного из клещей *Ixodes persulcatus* из Эстонии, к клещам *Hyalomma marginatum marginatum* (17 перкоксальных пассажей), которые не являются естественными переносчиками вируса, был получен вариант М [12]. Он отличался от родительского штамма более низким уровнем репродукции и мелкобляшечным фенотипом в культуре клеток СПЭВ и сниженной нейроинвазивностью для белых мышей [1; 12]. При этом при заражении клещей *Hyalomma turanicum* вариант М достигал более высоких титров в клещах, чем родительский штамм ЭК-328. Иными словами, было показано, что адаптация ВКЭ к не характерному для вируса виду клещей привела к снижению нейроинвазивности. Пониженной нейроинвазивностью также обладал вариант, полученный при адаптации штамма 4387 европейского генотипа ВКЭ, выделенного из органов рыжей полёвки, к клещам *I. ricinus* – одному из основных переносчиков вируса [9]. В связи с вышесказанным цель настоящей работы – оценить нейроинвазивность вариантов ВКЭ, полученных при адаптации вирусной популяции к клещам *I. ricinus* (один из основных переносчиков ВКЭ) и *Dermacentor reticulatus* (второстепенный переносчик вируса).

Материал и методы исследования

Культура клеток млекопитающих

Перевиваемую культуру клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ) поддерживали при температуре 37°C, как описано ранее [12]. 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 штамм ЭК-328 ВКЭ (GenBank: DQ486861.1, [12]) сибирского генотипа, первоначально выделенный из пула клещей *I. persulcatus* в 1972 г. в Эстонии.

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 VALB/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 *I. ricinus* и *D. reticulatus*, исходные самки которых были собраны в Калужской области. В лабораторных условиях клещей содержали в пробирках дифференцированной влажности [3]. Кормление клещей проводили по стандартной методике [2]. Для питания самок *I. ricinus* и их потомства, а также неполовозрелых фаз клещей *D. reticulatus* для поддержания лабораторной культуры использовали белых б/п мышей, на которых надевали картонные воротнички для предотвращения счесывания клещей. На одну мышь сажали не более 1 оплодотворенной самки или 20 нимф или 200 личинок клещей. Перед посадкой неполовозрелых фаз клещей мышь сажали в стеклянную банку и ставили в кювет с водой для предотвращения расползания клещей. Клещей на мышь подсаживали кисточкой, после чего банку с мышью сверху закрывали мельничным газом. По прошествии нескольких часов мышь пересаживали в индивидуальную клетку с решетчатым дном и поддоном с водой снизу. Напивавшихся и отпавших через решетчатое дно клетки в поддон с водой клещей изымали, просушивали на фильтровальной бумаге и помещали в пробирки дифференцированной влажности. Напивавшихся клещей содержали при комнатной температуре до завершения линьки, после чего убирали в холодильник (+4°C).

Перед посадкой половозрелых клещей *I. ricinus* на спине у мыши в области лопаток выстригали шерсть по периметру квадрата 1,5x1,5 см, куда затем приклеивали квадрат такого же размера из нескольких слоев марли. После того как клей высыхал (1-2 часа) под марлевую наклейку помещали 1 оплодотворенную самку. После завершения питания самку вынимали из-под наклейки и помещали в пробирку дифференцированной влажности при комнатной температуре для откладки яиц.

Для питания половозрелых клещей рода *Dermacentor* использовали кроликов. На одного кролика сажали не более 30 особей (20 самок и 10 самцов). Перед посадкой клещей кролику надевали пластмассовый ошейник для предотвращения счесывания клещей и на спине в области лопаток выстригали шерсть по периметру квадрата 5x5 см, куда затем приклеивали заранее сшитый колпачок из ткани такого же размера. После того как клей высыхал (1-2 часа) в колпачок помещали клещей. Каждый день колпачок развязывали, наблюдали за процессом питания клещей и, при необходимости, снимали их с кролика.

Титрование вируса методом бляшек

Титры вируса определяли методом бляшек под агаровым покрытием в культуре клеток СПЭВ на пластиковых 6-луночных планшетах согласно описанной методике [5]. 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) или мозговой суспензии.

Проведение пассажей ВКЭ в клещах разных видов

Вирус пассировали на каждом виде клещей в 2 параллельных линиях по 10-15 особей в каждой. Заражение клещей проводили перкоксальным методом [5], с использованием штамма ЭК-328 ВКЭ. Доза вируса для клеща при первом заражении составляла в среднем 3 lgБОЕ. После заражения клещей содержали в пробирках дифференцированной влажности 2 недели и регистрировали их смертность. Затем живых клещей замораживали при -70°C до следующего пассажа. Для проведения пассажа из пула клещей готовили клещевую суспензию в среде 199 (см. ниже) и полученным материалом заражали следующую партию клещей. После каждого пассажа некоторый объем клещевых суспензий замораживался для дальнейшего проведения титрования вируса методом бляшек.

Для получения рабочих клещевых суспензий каждого клеща промывали сначала в 70% этиловом спирте, а затем дважды – в физиологическом растворе со смесью антибиотиков (100 ед/мл пенициллин и 0,0001 г/мл стрептомицин). После этого клещей одного вида и из одной линии гомогенизировали вместе пестиком в отдельной ступке, добавляли среду 199 на растворе Эрла с антибиотиками (см. выше) и переносили в пробирки типа эппендорф. Количество вносимой среды 199 бралось из расчета по 50 мкл на особь для клещей *I. ricinus* и по 100 мкл на особь для клещей *D. reticulatus*. От всех полученных суспензий отбиралось по 30 мкл для проведения следующего пассажа.

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 [10]. Нейроинвазивность штаммов оценивали по количеству БОЕ вируса, которое соответствует 1 LD_{50} для мышей.

Результаты исследования и их обсуждение

В данной работе для некоторых вариантов, адаптированных к иксосодам разных видов, мы оценили нейроинвазивность для лабораторных мышей при i/p введении вируса, для чего мы использовали такой показатель как количество БОЕ, вызывающих гибель 50% животных, т.е. LD₅₀, выраженную через БОЕ.

Для исходного штамма ЭК-328 были проведены специальные исследования, посвященные определению его нейроинвазивности в зависимости от системы, в которой он размножался. Согласно результатам 4 независимых экспериментов для вируса, полученного при репродукции штамма ЭК-328 в мозге белых мышей, 1 LD₅₀ соответствовала в среднем 5 БОЕ (0,7±0,6 lgБОЕ). Для вируса, полученного при размножении штамма ЭК-328 в перевиваемой культуре клеток СПЭВ, указанное соотношение по результатам 5 экспериментов составило 50 БОЕ (1,7±0,3 lgБОЕ; Таблица 1). Таким образом, вирулентность ВКЭ, прошедшего размножение в клетках ЦНС мыши, достоверно выше по критерию Стьюдента ($p < 0,05$), чем у вируса после репродукции в культуре клеток СПЭВ. Это означает, что вирулентность вируса определяется системой, в которой он был получен.

Для пассажей в клещах был использован штамм ЭК-328 в виде КЖ инфицированных клеток СПЭВ. Результаты оценки вирулентности адаптированных к разным видам клещей вариантов штамма ЭК-328 приведены в Таблице 1. Согласно нашим данным, при адаптации ВКЭ к клещам *I. ricinus* на уровне 4 пассажей вирулентность вирусной популяции не снижается, а наоборот повышается до показателей, характерных для наиболее перmissive системы для репродукции – клеток ЦНС. Однако после 6-ти пассажей штамма ЭК-328 в клещах *I. ricinus* нейроинвазивность полученного варианта оказалась достоверно ниже (1 LD₅₀~500 БОЕ), чем верхний предел, определенный из 5 экспериментов при анализе нейроинвазивности исходного штамма, полученного в культуре клеток СПЭВ (1 LD₅₀~50 БОЕ; критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$) (Таблица 1). Данное изменение сопровождалось появлением вирионов в популяции варианта, образующих мелкие бляшки (диаметр 1,5-2,5 мм; Таблица 1) в культуре клеток СПЭВ под агаровым покрытием.

Вариант тв1098, прошедший 7 пассажей в клещах *D. reticulatus*, помимо образования мелких бляшек в культуре клеток СПЭВ (Таблица 1) также демонстрировал сниженную нейроинвазивность для белых мышей. Согласно квадратичным отклонениям, полученным в опыте по оценке нейроинвазивности штамма ЭК-328, адаптированного к репродукции в клетках ЦНС мыши и в культуре клеток СПЭВ, данное изменение статистически отличается от нейроинвазивности исходного культурального штамма ЭК-328 (критерий Стьюдента, $p < 0,05$). К сожалению, мы не можем определить с какого пассажа в клещах *D. reticulatus*

происходит изменение свойств вирусной популяции, т.к. анализ более ранних пассажей в данной работе не проводился.

Таким образом, при адаптации ВКЭ как к основным, так и к второстепенным клещам-переносчикам вируса наблюдалось изменение свойств вирусной популяции – появление бляшек малого размера наряду с крупными бляшками в культуре клеток СПЭВ и снижение нейроиновзависимости вируса.

Таблица 1

Вирулентность вариантов штамма ЭК-328, адаптированных к клещам разных видов путем перкоксальных пассажей, при интраперитонеальном введении мышам линии BALB/c.

Вариант вируса	Пассажная история	Размер бляшек*, мм	Титр ВКЭ, IgБОЕ в мл 1%-ой клещевой суспензии**	Вирулентность для мышей при i/p введении вируса	
				IgLD ₅₀ /мл	LD ₅₀ , выраженное в БОЕ, в скобках указаны lg
исходный штамм ЭК-328 в виде КЖ клеток СПЭВ		6-8	7,3±0,3 (n=10)	5,1±0,6 (n=5)	50 (1,7±0,3)
исходный штамм ЭК-328 в виде мозговой суспензии		6-8	8,9±0,2 (n=9)	7,4±0,4 (n=7)	5 (0,7±0,6)
тв1011 линия 1	4-ый пассаж на клещах <i>I. ricinus</i>	3-4	5,55	5	6 (0,8)
тв1012 линия 2	4-ый пассаж на клещах <i>I. ricinus</i>	4-5	5,07	4,4	6 (0,8)
тв1090 линия 1	6-ой пассаж на клещах <i>I. ricinus</i>	10:(1,5-2,5) мм = 5:8	6,2	3,4	500 (2,7)
тв1098	7-ой пассаж на клещах <i>D. reticulatus</i>	6:3:1 мм = 13:13:10	5,0	2	300 (2,5)

* размер бляшек оценивали на 7-ой день после заражения культуры клеток СПЭВ.

**для исходного штамма ЭК-328 титр вируса выражен в IgБОЕ/мл.

n – количество проделанных независимых экспериментов.

Необходимо отметить, что при выделении ВКЭ из клещей значительную часть составляют штаммы, обладающие мелкобляшечным фенотипом в культуре клеток СПЭВ [4; 8]. Можно предположить, что такие варианты отбираются под селективным воздействием при репродукции в организме клеща.

Согласно нашим данным, снижение нейроиновзависимости ВКЭ при его репродукции в клещах коррелировало не с изменением размера бляшек, а именно с появлением мелких бляшек менее 1 мм в диаметре. Изменение свойств вирусной популяции при адаптации к клещам наблюдается в разных видах клещей – как основных переносчиках вируса (*I. ricinus*, *I. persulcatus*), так и второстепенных (*H. marginatum*, *D. reticulatus*) [1; 7; 9; 12]. Изменение свойств вируса, вероятно, связано с появлением специфических мутаций в белке Е [7; 9; 12],

который отвечает за связывание и проникновение вириона в клетку. Указанные мутации в подавляющем большинстве вызывали повышение локального положительного заряда вириона, что оказывало влияние на афинность вирионов к гликозаминогликанам клеток. Успешность репродукции ВКЭ в различных системах, возможно, также связана с мутациями в области 5'-НТО [6], играющей важную роль при репликации вируса.

Мы отдаем себе отчет, что пассирование вируса в клещах подразумевает повторение острой инфекции во все новых особях, чего в природном очаге никогда не происходит. В активном очаге КЭ или постоянно переходит из переносчика в хозяина и наоборот, или в связи с малой численностью прокормителей и неблагоприятными климатическими условиями длительное время находится в переносчике или в позвоночном хозяине. Тем не менее, проведенные нами модельные исследования продемонстрировали селективное воздействие организма клеща, оказываемое на вирусную популяцию. Данная работа – это следующий шаг к пониманию связи характеристик биоценоза и свойств вирусной популяции в природном очаге КЭ.

Заключение

Репродукция ВКЭ в клещах – основных переносчиках может приводить к повышению нейроинвазивности вируса, что указывает на схожее первоначальное селективное воздействие клеток клещей и клеток ЦНС млекопитающих, несмотря на различные максимальные титры вируса в данных системах.

Адаптация ВКЭ к клещам путем пассирования приводит к отбору вариантов со сниженной нейроинвазивностью, что коррелирует с появлением в популяции мелкобляшечных вариантов вируса. Данные изменения наблюдаются при адаптации вируса как к основным, так и к второстепенным переносчикам.

Данная работа поддержана грантами РФФИ № 14-04-31716 и 15-04-04500.

Список литературы

1. Дживанян, Т.И. Изменение зависимых от хозяина характеристик вируса клещевого энцефалита при его адаптации к клещам и переадаптации к белым мышам / Т.И. Дживанян, М.Б. Королев, Г.Г. Карганова [и др.] // *Вопр. вирусол.* – 1988. - №5. – С. 589-595.
2. Методы определения эффективности инсектицидов, акарицидов, регуляторов развития и репеллентов, используемых в медицинской дезинсекции // МУК 3.5.2 1759-03. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. – 2004. – 87с.
3. Нельзина, Е.Н. Крысиный клещ. // М.: Изд-во АМН СССР. – 1950. – 100с.
4. Погодина, В.В. Явление антигенной дефектности у циркулирующих в природе штаммов вируса клещевого энцефалита и его возможная связь с серонегативными формами

заболевания / В.В. Погодина, Н.Г. Бочкова, Т.И. Дживанян [и др.] // Вопр. вирусол. – 1992. - №2. – С.103-107.

5. Belova, O.A., Burenkova, L.A., Karganova, G.G. 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 – 2012, No 3. – P. 240– 246.

6. Chausov, E.V., Ternovoi, V.A., Protopopova, E.V., et al. Variability of the tick-borne encephalitis virus genome in the 5' noncoding region derived from ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* in Western Siberia // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2010. – Vol. 10, No 4. – P. 365-375.

7. Khasnatinov, M.A., Ustanikova, K., Frolova, T.V., et al. Non-hemagglutinating flaviviruses: molecular mechanisms for the emergence of new strains via adaptation to European ticks. // PLoS One. – 2009. – Vol.4, No 10. - e7295.

8. Kozlovskaya, L.I., Osolodkin, D.I., Shevtsova, A.S., et al. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus // Virology. – 2010. – Vol. 398, No 2. – P. 262-272.

9. Labuda, M., Jiang, W.R., Kaluzova, M., et al. Change in phenotype of tick-borne encephalitis virus following passage in *Ixodes ricinus* ticks and associated amino acid substitution in envelope protein. // Virus Res. – 1994. – Vol. 31 – P. 305-315.

10. Lorenz, R.J., Bogel, K. Methods of calculation. / In: Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), Laboratory techniques in rabies, 3rd ed. World Health Organization, Geneva. – 1973. – P. 321–335.

11. Mandl, C.W., Kroschewski, H., Allison, S.L. et al. Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo. // J. Virol. – 2001. – Vol. 75. – P. 5627-5637.

12. Romanova, L.Iu., Gmyl, A.P., Dzhivanian, T.I. et al. Microevolution of Tick-Borne Encephalitis virus in course of host alternation. // Virology. – 2007. – Vol. 362, No 1. – P. 75-84.

Рецензенты:

Михайлов М.И., д.м.н., профессор, директор ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», г. Москва;

Ткаченко Е.А., д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе, ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», г. Москва.