

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 578.833.26:578.53].083:577.21.08(571.14)

Бахвалова В.Н.¹, Чичерина Г.С.¹, Панов В.В.¹, Глунов В.В.¹, Морозова О.В.²

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТИПОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА СРЕДИ СПОНТАННО ИНФИЦИРОВАННЫХ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ И МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» Сибирского отделения РАН, 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 11; ²ФГБУ «Федерального центра эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; ³ФГБУН «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России, 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а

Сравнительный анализ вирусносительства и распределения генетических типов вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) среди беспозвоночных (2 вида иксодовых клещей *Ixodes persulcatus* Schulze и *Ixodes pavlovskyi* Pomerantsev 1946) и позвоночных резервуарных хозяев (4 вида мелких грызунов: красная полевка *Myodes rutilus* Pallas, красно-серая полевка *Myodes rufocanus* Sundevall, полевая мышь *Apodemus agrarius* Pallas, лесная мышовка *Sicista betulina* Pallas и 1 вид насекомоядных – обыкновенная бурозубка *Sorex araneus* L (1758)), доминирующих на территории Новосибирской области в 2009–2014 гг., вирусологическими и молекулярно-биологическими методами показал, что частоты детекции РНК и/или белка Е у млекопитающих (70,9±3,0%) существенно превышали уровни вирусифорности клещей (3,4±0,4). При циркуляции в природных популяциях 3 основных типов ВКЭ – дальневосточного (ДВ), сибирского (Сиб) и европейского (Евр) в моно- или политиповой формах у клещей преобладал Сиб ($p < 0,01$), у мелких млекопитающих – ДВ-тип ($p < 0,001$). При этом количества геном-эквивалентов ДВ-типа в среднем составляли $3,2 \cdot 10^4$ копий в клеще; Сиб и Евр – приблизительно в 10 и 100 раз меньше соответственно. В крови диких грызунов количества РНК ДВ-типа ВКЭ варьировали в диапазоне до $2,4 \cdot 10^5$ в 1 мл, Сиб типа – до $2,4 \cdot 10^2$. С учетом потребляемого личинками и нимфами объема крови млекопитающих возможно попадание в клеща нескольких сотен и тысяч соответственно вирусных геномов ДВ-типа и только единичных РНК Сиб типа ВКЭ. Пассирование изолятов ВКЭ от диких резервуарных хозяев в лабораторных мышах приводило к трансформациям исходного генетического состава. При минимальных генетических перестройках патогенных изолятов ВКЭ в инфицированных мышах-сосунках трансформация апатогенных изолятов была значительной. Политиповой состав природных популяций ВКЭ следует учитывать при разработках диагностических и профилактических препаратов.

Ключевые слова: флавивирус; молекулярное типирование; обратная транскрипция с последующей ПЦР в реальном времени с генотип-специфичными зондами; филогенетический анализ; адаптация к резервуарным хозяевам.

Для цитирования: Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015; 20 (4): 26–34.

Bakhvalova V. N.¹, Chicherina G. S.¹, Panov V. V.¹, Glupov V. V.¹, Morozova O. V.²

DISTRIBUTION OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS AMONG NATURALLY INFECTED IXODID TICKS AND SMALL MAMMALS IN THE NOVOSIBIRSK REGION

¹Institute of Systematics and Ecology of Animals of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 11, Frunze str., Novosibirsk, Russian Federation, 630091

²Research Center of Epidemiology and Microbiology Center named after Academician N.F. Gamaleya, 16, Gamaleya Str. Moscow, Russian Federation, 123098

³Scientific-Research Institute of Physical Chemical Medicine, 1a, Malaya Pirogovskaya str., Moscow, Russia Federation, 119828,

A comparative analysis of the virus infection carrier state and distribution of genetic types of the virus of tick-borne encephalitis (TBE) among invertebrates (2 species of ticks, *Ixodes persulcatus* Schulze and *Ixodes pavlovskyi* Pomerantsev 1946) and vertebrate reservoir hosts (4 species of small rodents: the red vole *Myodes rutilus* Pallas, gray-sided vole *Myodes rufocanus* Sundevall, field mouse *Apodemus agrarius* Pallas, birch mice *Sicista betulina* Pallas and 1 species of insectivores - common shrew *Sorex araneus* L (1758)), dominating on the territory of the Novosibirsk region in 2009–14 years, was performed with the use of virological and molecular biological methods. Frequency detection of RNA and / or E protein in mammals (70,9 ± 3,0%) were shown to considerably exceed levels of virus infection carrier state rate of ticks (3,4 ± 0,4). In the circulation of three major types of TBE - Far East (FE), Siberian (NIB) and European (Eur) in natural populations in mono - or polytype forms in mites Sib type prevailed ($p < 0,01$), in small mammals - ET type ($p < 0,001$). At the same time the number of genome equivalents FE type in average accounted for $3.2 \cdot 10^4$ copies in the mite; Sib and Eur - about 10 and 100 times lower, respectively. In the blood of wild rodents, the amount of RNA of FE of type TBEV ranged from $2.4 \cdot 10^5$ mL, of Sib type - $2.4 \cdot 10^2$. With account of blood volume of mammals consumed by larvae and nymphs, the falling of several hundreds and thousands of viral genomes such as DV and only single type of RNA Sib IRB, respectively, is possible in the tick. Passaging TBE isolates from wild reservoir hosts in laboratory mice lead to the transformation of the original genetic composition. In minimal genetic rearrangements of pathogenic isolates of TBE in infected mice-suckers the transformation of apathogenic isolates was significant. The polytype composition of natural populations of TBE should be considered in the development of diagnostic and preventive preparations.

Для корреспонденции: Бахвалова Валентина Николаевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. патологии насекомых, e-mail: bvntbe@yandex.ru

Клещевой энцефалит (КЭ) – опасное для человека природно-очаговое заболевание вирусной этиологии с преимущественным поражением центральной нервной системы с периодическими подъемами и спадами уровней заболеваемости. Переносчиком возбудителя – вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) – являются иксодовые клещи, паразитирующие на позвоночных. ВКЭ относится к семейству *Flaviviridae* вирусов с геномной РНК-положительной полярности и длиной 10,500–11,000 нуклеотидных остатков. Молекулярно-генетический и антигенный анализ показал существование трех основных типов ВКЭ: дальневосточного (ДВ), европейского (Евр) и сибирского (Сиб), а также 2 минорных типов [1] и новых вариантов ВКЭ, вызывающих летальные геморрагические формы инфекции [2]. Оценки уровней смертности и частот персистентных форм инфекции существенно различаются для разных типов ВКЭ. Уровни летальных исходов достигают 20–60% от общего числа инфицированных лиц для ДВ-типа, 6–8 и 1–2% для Сиб и западноевропейского типов соответственно [3]. Наиболее высокие частоты хронизации инфекции отмечены для инфекций ВКЭ Сиб типа [3].

Цель работы – молекулярно-генетический анализ изолятов ВКЭ от иксодовых клещей и мелких млекопитающих методами ОТ-ПЦР-РВ и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей.

Материалы и методы

Иксодовые клещи и дикие мелкие млекопитающие для исследований ВКЭ. Голодных половозрелых иксодовых клещей и диких мелких млекопитающих отлавливали в 2009–2014 гг. на территории стационарного участка – антропогенного очага КЭ в лесопарке Новосибирска (54°49' с.ш., 83°05' в.д.). Видовую принадлежность иксодовых клещей после сбора с растительности на флаг определяли по морфологическим признакам, согласно классической методике фенотипической дифференциации иксодовых клещей [4, 5]. Отловы мелких грызунов и насекомоядных проводили в те же годы на той же территории, что и клещей. Определение вида, пола и возраста мелких грызунов и насекомоядных осуществляли в соответствии с [6].

Детекция ВКЭ. Детекцию ВКЭ проводили с использованием комплекса методов: ОТ-ПЦР-РВ, иммуноферментного анализа (ИФА) на антиген ВКЭ с использованием набора “ВектоВКЭ-антиген-стрип” (ЗАО “Вектор-Бест”, Новосибирск) и биопробы на 1–3-суточных или 10–12-суточных лабораторных мышях ICR [7]. Идентификацию патогенных для

лабораторных мышей изолятов ВКЭ осуществляли посредством реакции биологической нейтрализации на мышах ICR массой 8–10 г [8], реакции торможения гемагглютинации с гусиными эритроцитами [9], а также молекулярного типирования в ОТ-ПЦР-РВ с праймерами и генотипспецифичными флуоресцентными зондами, соответствующими генам *NS1* и *NS5* ВКЭ [7, 10], и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *E* и *NS1* ВКЭ [11]. Нейровирулентность вируса определяли посредством внутримозгового и подкожного титрования 10-кратных разведений вирусиферных суспензий на мышах ICR массой 8–10 г.

Имаго клещей анализировали индивидуально. После определения видовой принадлежности и пола клещей раскладывали в микропробирки и до исследований хранили не более 1 нед в холодильнике при температуре 4°C. Для исследования брали только живых клещей, промывали 70% этанолом, трехкратно – физиологическим раствором, затем растирали в отдельных пластиковых микропробирках (1,5 мл) металлическими пестиками в 200 мкл физиологического раствора.

Из тщательно отмытых физиологическим раствором образцов головного мозга и селезенки, а также из сгустков крови млекопитающих посредством растирания в ступках готовили 10% суспензии в физиологическом растворе. Для исключения повторного размораживания суспензии клещей, органов и сгустков крови млекопитающих разливали в микропробирки по 50 мкл; для выделения РНК в пробирку с гомогенатом добавляли 3 объема 5,5 М раствора гуанидинизотиоцианата, до исследования хранили при -70°C.

Определение нуклеотидных последовательностей генов *E* и *NS1* для изолятов РНК ВКЭ из гомогенатов клещей и мозга биопробных мышей проводили в Центре секвенирования ДНК ФГБУН ИХБФМ СО РАН (Новосибирск) с использованием автоматического анализатора ДНК модели ABI 310 (Applied Biosystems, США) и набора BigDye 3.1. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили при помощи программного обеспечения Mega 6.06 (<http://www.megasoftware.net/>) с использованием пяти альтернативных алгоритмов по 1000 репликаций [11].

Вирусные нагрузки оценивали с использованием количественной ОТ-ПЦР-РВ с калибровочным графиком зависимости пороговых циклов (Ct) флуоресценции от количеств рекомбинантной плазмидной ДНК ВКЭ [10].

Статистическое сравнение выборочных долей и абсолютных количеств проводили по критерию

Таблица 1

Сравнение вирусофорности, нейровирулентности вирусных изолятов и распределение генетических типов ВКЭ у иксодовых клещей на территории Новосибирской области

Вид клеща	Патогенность изолятов ВКЭ для лабораторных мышей	Вирусофорность (% = m^1)	Нейровирулентность изолятов ВКЭ от иксодовых клещей ($\lg LD_{50} \pm m^1$)		Число образцов для молекулярного типирования	Частота типов ВКЭ среди клещей, положительных в ОТ-ПЦР-РВ			
			внутри мозговые титры	подкожные титры		ДВ	Сиб	Евр	смешанная инфекция разными типами ВКЭ
<i>Ixodes pavlovskiy</i>	Патогенный	1,8±0,3** 28/1514	3,86±0,32	2,26±0,3	Патогенный (n = 23)	95,7±4,3 22/23	91,3±6,0 21/23	9,5±6,6 2/21	91,3±6,0 21/23
	Апатогенный	1,5±0,5 22/1514	–	–	Апатогенный (n = 7)	14,3±14,3 1/7	85,7±14,2 6/7	28,5±18,4 2/7	14,3±14,3 1/7
	Всего	3,3±0,5 50/1514	–	–	Всего (n = 30)	76,7±7,9* 23/30	90,0±5,6 27/30	14,3±6,7 4/28	73,3±8,2 22/30
<i>Ixodes persulcatus</i>	Патогенный	0,8±0,4** 9/1146	3,18±0,44	1,93±0,5	Патогенный (n = 8)	100,0 8/8	100,0 8/8	12,5±12,5 1/8	100,0 8/8
	Апатогенный	2,8±0,5 32/1146	–	–	Апатогенный (n = 21)	23,8±9,5 5/21	76,1±9,5 16/21	14,3±7,8 3/21	14,3±7,8 3/21
	Всего	3,6±0,6 41/1146	–	–	Всего (n = 29)	44,8±9,4* 13/29	82,8±7,1 24/29	13,8±6,5 4/29	37,9±9,2 11/29
Всего ...	Патогенный	1,4±0,2 37/2660	3,64±0,25	2,12±0,25	Патогенный (n = 31)	96,8±3,2 30/31	93,5±4,5 29/31	9,7±5,4 3/31	93,5±4,5 29/31
	Апатогенный	2,0±0,3 54/2660	–	–	Апатогенный (n = 28)	21,4±7,9 6/28	78,6±7,9 22/28	17,9±7,4 5/28	14,2±6,7 4/28
	Всего	3,4±0,4 91/2660	–	–	Всего (n = 59)	61,0±6,4*** 36/59	84,7±4,7*** 51/59	14,0±4,6 8/59	55,9±6,5 33/59

Примечание. m^1 – статистическая погрешность процента и инфекционного титра $\lg LD_{50}$, *, ** – уровни статистической значимости различий; $p < 0,05$, $p < 0,01$ соответственно.

Стьюдента, принят уровень значимости различий $p < 0,05$. В тексте и таблицах для выборочных долей приведены ошибки репрезентативности [12].

Работу с инфекционным ВКЭ и потенциально опасным материалом выполняли в лаборатории, аттестованной для работы с патогенами второй группы опасности для человека Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (лицензия № 77.99.18.001.Л.000032.03.08 от 05.03.08).

Содержание, кормление, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12 августа 1977 г. № 755).

Результаты и обсуждение

В сообществе иксодовых клещей на территории исследуемого очага отмечены два наиболее массовых вида: таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze и клещ Павловского *Ixodes pavlovskiy* Pomerantsev 1946 [13, 14]. Доля клеща Павловского в очаге в сборах с растительности в среднем составила 70,8±0,7%. При этом на участках, расположенных

до 3 км от населенного пункта, доля *I. pavlovskiy* в отловах клещей достигала более 90%.

Детекция и молекулярное типирование ВКЭ у клещей

Детекция ВКЭ посредством комплекса вирусологических и молекулярно-биологических методов в 2660 имаго клещей двух видов выявила в среднем 3,4±0,4% инфицированных особей. При этом лишь 1,4±0,2% содержали патогенный для лабораторных мышей ВКЭ, РНК ВКЭ и белок оболочки вирионов Е, а остальные 2,0±0,3% не вызывали признаков КЭ у мышей. Частоты детекции ВКЭ у клещей Павловского и таежного статистически не различались, но частота обнаружений патогенного вируса по данным биопробы у клеща Павловского (1,8±0,3%) значимо превосходила ($p < 0,01$) таковую у таежного клеща (0,8±0,3%) (табл. 1).

При титровании ВКЭ непосредственно из вирусофорных суспензий клещей на лабораторных мышках значимых различий нейровирулентности у иксодид двух видов не выявлено. Усредненные за период исследований инфекционные титры вируса у *I. pavlovskiy* и *I. persulcatus* при внутримозговом заражении составляли 3,86±0,3 и 3,18±0,4 $\lg LD_{50}$, при подкожном заражении – 2,26±0,3 и 1,93±0,5 $\lg LD_{50}$ соответственно (см. табл. 1).

Количественные оценки ВКЭ в клещах и мелких млекопитающих

Вид клещей и мелких млекопитающих	ДВ	Сиб	Евр
	средний пороговый цикл (С \pm м) и диапазон (мин.–макс.)	средний пороговый цикл (С \pm м) и диапазон (мин.–макс.)	средний пороговый цикл (С \pm м) и диапазон (мин.–макс.)
Клещ Павловского <i>Ixodes pavlovskyi</i>	28,8 \pm 1,0 (15,9–41,4)	31,1 \pm 1,5 (15,3–47,5)	31,4 \pm 1,4 (20,9–41,3)
Тажный клещ <i>Ixodes persulcatus</i>	28,3 \pm 1,4 (17,0–42,0)	36,4 \pm 1,6 (22,3–49,5)	41,4 \pm 0,8 (34,7–46,1)
В с е г о в клещах ...	28,6 \pm 1,0 (15,9–42,0)	33,6 \pm 1,1 (15,3–49,5)	36,4 \pm 1,0 (20,9–46,1)
Красная полевка <i>Myodes rutilus</i> Pallas:			
органы	38,6 \pm 4,9 (26,6–49,6)	37,3 \pm 1,4 (24,8–45,8)	Н.и.
клетки крови	30,9 \pm 1,0 (11,8–48,1)	40,8 \pm 1,1 (35,4–46,4)	Н.и.
Полевая мышь <i>Apodemus agrarius</i> Pallas:			
органы	33,6 \pm 1,7 (11,9–49,6)	36,9 \pm 2,8 (22,9–46,5)	52,7
клетки крови	33,7 \pm 1,4 (11,9–49,6)	35,0 \pm 1,0 (22,9–46,2)	Н.и.
Красно-серая полевка <i>Myodes rufocanus</i> Sundevall:			
органы	26,1 \pm 4,8 (10,7–41,4)	33,8 \pm 2,3 (18,3–42,7)	Н.и.
Лесная мышовка <i>Sicista betulina</i> Pallas:			
органы	35,6 \pm 3,5 (19,5–49,3)	32,6 \pm 2,4 (22,4–46,2)	Н.и.
Грызуны:			
органы	33,7 \pm 2,1 (11,9–49,6)	35,0 \pm 1,2 (22,9–46,2)	52,7
клетки крови	31,8 \pm 1,1 (11,8–49,6)	39,6 \pm 1,0 (22,9–46,4)	Н.и.
Обыкновенная бурозубка <i>Sorex araneus</i> L.:			
органы	40,5 \pm 2,3 (14,0–50,3)	29,8 \pm 2,6 (25,6–48,1)	29,0 \pm 2,5 (26,0–31,9)
В с е г о в мелких млекопитающих:			
органы	36,0 \pm 1,3 (10,7–52,5)	36,0 \pm 1,4 (22,9–48,1)	36,9 \pm 10,0 (26,0–52,7)

Молекулярное типирование посредством ОТ-ПЦР-РВ и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *E* и *NS1* изолятов РНК ВКЭ от клещей (см. рисунок) показали моно- или смешанные формы инфекции тремя основными типами ВКЭ. Анализ генетического состава ВКЭ у инфицированных иксодид обоих видов показал, что в среднем превалировала доля особей с Сиб-типом (84,7 \pm 4,7%), значимо ($p < 0,01$) меньше была доля клещей с ДВ-типом – 61,0 \pm 6,4% и еще меньше Евр – 14,0 \pm 4,6% (см. табл. 1). Вместе с тем у *I. pavlovskyi* доля особей, содержащих ДВ-тип (76,7 \pm 7,9%), была

достоверно ($p < 0,05$) выше таковой у *I. persulcatus* (44,8 \pm 9,4%) (см. табл. 1). При этом доли Сиб-типа у разных видов клещей были близкими (90,0 \pm 5,6 и 82,8 \pm 7,1%) и Евр-типа ВКЭ – 14,3 \pm 6,7 и 13,8 \pm 6,5% (см. табл. 1). Исходя из сходных значений пороговых циклов (31,1 \pm 1,5 и 36,4 \pm 1,6), вирусные нагрузки также были близкими (табл. 2).

Выявлены особенности генетического состава ВКЭ в клещевых суспензиях в зависимости от патогенности для мышей ICR (см. табл. 1). В абсолютном большинстве клещей обоих видов, содержащих патогенный ВКЭ, обнаружена смесь в основном ДВ- и

Сравнение вирусоносительства с распределением трех основных типов ВКЭ среди мелких млекопитающих

Виды млекопитающих	Доля животных с РНК ВКЭ (%) ($\bar{A} \pm m$), X/n	Доля животных, инфицированных ВКЭ определенного типа, среди образцов, положительных в ОТ-ПЦР-РВ, %			
		ДВ ($\bar{A} \pm m$)	Сиб ($\bar{A} \pm m$)	Евр ($\bar{A} \pm m$)	Смешанная инфекция ($\bar{A} \pm m$)
Красная полевка <i>Myodes rutilus</i> Pallas:					
органы	78,1±7,4 25/32	84,0±7,4 21/25	52,0±10,2 13/25	0 0/15	36,0±9,8 9/25
клетки крови	82,2±5,8 37/45	91,9±4,5 34/37	54,1±8,3 20/37	Н.и.	45,9±8,3 17/37
Красно-серая полевка <i>Myodes rufocanus</i> Sundevall:					
органы	46,2±8,1 18/39	66,7±11,4 12/18	61,1±11,8 11/18	0 0/10	27,8±10,9 5/18
Полевая мышь <i>Apodemus agrarius</i> Pallas:					
органы	35,3±8,3 12/34	41,7±14,9 5/12	75,0±13,0 9/12	14,3±14,3 1/7	25,0±13,0 3/12
клетки крови	47,0±8,7 16/34	93,8±6,2 15/16	31,3±12,0 5/16	Н.и.	25,0±11,2 4/16
Лесная мышовка <i>Sicista betulina</i> Pallas:					
органы	77,8±10,0 14/18	64,3±13,3 9/14	85,7±9,7 12/14	0 0/12	50,0±13,9 7/14
Обыкновенная бурозубка <i>Sorex araneus</i> L.:					
органы	73,3±8,2 22/30	77,2±9,2 17/22	45,5±10,8 10/22	28,6±12,5 4/14	31,8±10,2 7/22
Всего в органах мелких млекопитающих (грызунов и насекомоядных) ...					
	59,5±4,0 91/153	70,3±4,8 64/91	60,4±5,2 55/91	8,9±3,8 5/56	34,0±5,0 31/91
Всего в органах и крови мелких млекопитающих (грызунов и насекомоядных) ...					
	62,1±3,2 144/232	78,5±3,4* 113/144	55,6±4,2 80/144		36,1±4,0 52/144

Примечание. $\bar{A} \pm m$: \bar{A} – % животных, содержащих РНК ВКЭ среди исследованных, m – статистическая погрешность (в %); * – уровень статистической значимости отличий $p < 0,001$.

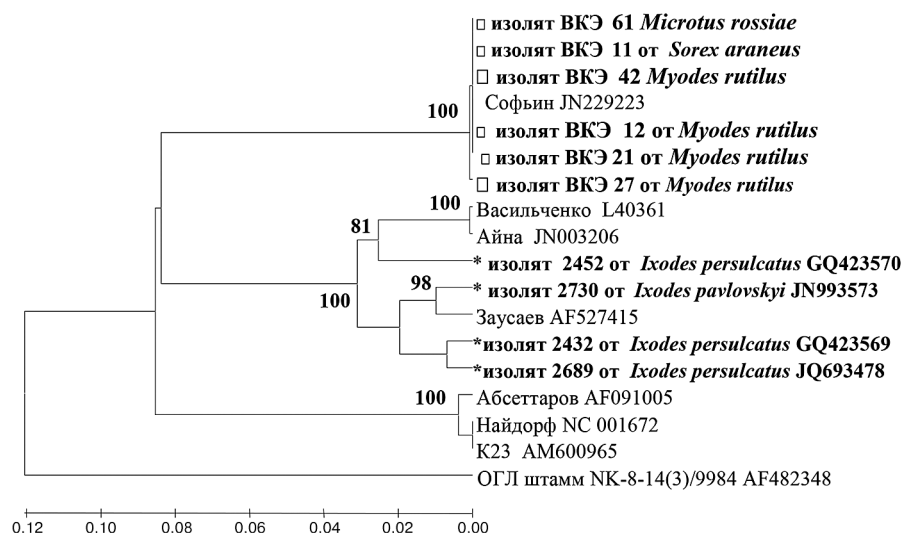
Сиб-типов. Напротив, среди клещей с апатогенным ВКЭ детектировали преимущественно моноинфекции РНК ВКЭ и лишь у 14,2±6,7% из них смесь ДВ- и Сиб-субтипов.

Таким образом, сравнительное изучение зараженности *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus* показало, что спектр основных генетических типов и нейровирулентность ВКЭ не имели значимых различий у двух видов. Вместе с тем доли клещей с патогенным для лабораторных мышей вирусом и более опасным для человека ДВ-типом ВКЭ были значимо больше у клеща Павловского по сравнению с таежным.

Детекция и молекулярное типирование ВКЭ у мелких млекопитающих. Мелкие грызуны – красная полевка *Myodes rutilus* Pallas, красно-серая полевка *Myodes rufocanus* Sundevall, полевая мышь *Apodemus agrarius* Pallas, лесная мышовка *Sicista betulina* Pallas и насекомоядные – обыкновенная бурозубка *Sorex araneus* L (1758) прокармливают личинок и нимф иксодовых клещей и являются резервуарными хозяевами ВКЭ на территории Новосибирской области [7].

Детекция ВКЭ в органах 153 особей перечисленных видов и крови 45 красных полевок и 34 полевых мышей посредством ОТ-ПЦР-РВ, иммуноферментного анализа (ИФА) на антиген Е ВКЭ и биопробы на мышах ICR показала, что инфицированность позвоночных хозяев ВКЭ (табл. 3) существенно превосходила зараженность иксодовых клещей (см. табл. 1). Однако патогенный для лабораторных мышей вирус среди образцов, содержащих субвирионные компоненты ВКЭ, обнаруживали в отличие от клещей только у единичных зверьков. При этом признаки КЭ у лабораторных мышей были стертыми, обычно без параличей и парезов, что могло быть обусловлено аттенуацией вируса при персистенции в организме диких млекопитающих [15].

Субвирионные компоненты (РНК ВКЭ и/или белок Е) и патогенный для лабораторных мышей ВКЭ были выявлены в пробах 70,9±3,0% исследованных зверьков. Частота детекции вирусной РНК в пробах органов млекопитающих составляла в среднем 62,1±3,2% (см. табл. 3). Встречаемость вирусной РНК в клетках крови красной полевки и полевой



Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *E* изолятов ВКЭ от иксодовых клещей и мелких млекопитающих на территории Новосибирской области (выделенные жирным шрифтом и звездочкой), с использованием ПО Mega 6.06 (UPGMA, 1000 репликаций). Внешняя группа: штамм NK-8-14(3)/9984 вируса омской геморрагической лихорадки (ОГЛ) (номер доступа в GenBank AF482348), выделенный от гамазового клеща *Androlaelaps casalis* на территории Новосибирской обл. в 1991 г. Референсные штаммы трех основных генетических типов ВКЭ: Софьин (дальневосточного типа); Айна, Васильченко и Заусаев (сибирского типа); Абсеттаров, Найдорф и K23 (европейского типа).

мышь соответствовала инфицированности образцов их органов.

Молекулярное типирование посредством ОТ-ПЦР-РВ с генотипспецифичными флуоресцентными зондами показало моно- или смешанные формы инфекции ДВ-, Сиб- и Евр-субтипами ВКЭ (см. табл. 3). В среднем среди инфицированных млекопитающих в отличие от клещей значимо чаще ($p < 0,001$) детектировали ДВ-тип у $78,5 \pm 3,4\%$, Сиб-тип у $55,6 \pm 4,2\%$, Евр-тип у $8,9 \pm 3,8\%$ особей. При этом смесь генетических субтипов ВКЭ обнаруживали как в одном, так и в разных органах у одной особи млекопитающих, в среднем у $36,1 \pm 6,4\%$ особей (см. табл. 3). Моноинфекция Евр-типа в отличие от клещей не выявлена ни у одного вида, но в смешанной форме РНК ВКЭ Евр-типа детектировали у полевой мыши и обыкновенной бурозубки.

В органах большинства видов мелких млекопитающих наблюдали относительное доминирование моноинфекции ДВ-типа ВКЭ по сравнению с таковой Сиб-типа. В крови полевой мыши и красной полевки выявлено достоверное ($p < 0,001$) преобладание образцов с моноинфекцией ДВ-типа.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *E* (см. рисунок) и *NS1* ВКЭ (данные не представлены) от клещей и из органов мелких млекопитающих показал инфекцию Сиб- и ДВ-типом ВКЭ, что соответствовало результатам ОТ-ПЦР-РВ с генотипспецифичными флуоресцентными зондами (см. табл. 1, 3) [7, 13, 14]. Необходимо отметить совпадение топологии деревьев, построенных с использованием пяти альтернативных алгоритмов ПО Mega 6.06, что наряду с высокими индексами поддержки кладиических групп (см.

рисунок) свидетельствует о достоверности молекулярного типирования на основании филогенетического анализа.

Количественные оценки. Пороговые циклы изолятов РНК ВКЭ от клещей варьировали в диапазоне от 15,3 до 49,5 (см. табл. 2). Средние пороговые циклы для ДВ-типа ВКЭ у двух видов клещей были сходными, а для Сиб- и Евр-типа у клеща Павловского достоверно меньше, чем у таежного клеща (см. табл. 2), что свидетельствовало о повышенных вирусных нагрузках и, следовательно, опасности *I. pavlovskyi*. На основании калибровочного графика зависимости пороговых циклов от количества генов-эквивалентов ВКЭ [10] и уравнения Лукьянова-Матца можно оценить средние количества молекул геномной РНК в инфицированных клещах: ДВ-тип – $3,2 \cdot 10^4$ копий в клеще; Сиб и Евр – приблизительно в 10 и 100 раз меньше соответственно. При этом для клеща Павловского количества РНК Сиб-типа ($5,7 \cdot 10^3$ в клеще) и Евр-типа ($4,7 \cdot 10^3$) были существенно больше по сравнению с таковыми у таежного клеща ($1,5 \cdot 10^2$ и $1,2 \cdot 10^1$ соответственно).

У диких млекопитающих средние пороговые циклы РНК ВКЭ в органах были сходными для трех основных типов ВКЭ (см. табл. 2), что соответствовало нескольким тысячам генов-эквивалентов РНК ВКЭ в мозге и селезенке. Необходимо отметить повышенные вирусные нагрузки ДВ- и Сиб-типов ВКЭ у мелких грызунов по сравнению с насекомоядными (см. табл. 2). Количество РНК ДВ-типа ВКЭ в 1 мл крови варьировали в диапазоне до $2,4 \cdot 10^5$ и Сиб-типа – до $2,4 \cdot 10^2$. Масса крови, поглощаемой за многодневный период питания на млекопитающих, составляет в среднем у личинок *I. persulcatus*

Таблица 4

Трансформация генетического состава ВКЭ из гомогенатов клещей и органов мелких млекопитающих в головном мозге лабораторных мышей ICR

Генетический состав ВКЭ в исходных образцах	Количество проб X/n' ($A \pm m$) ²	Генетический состав ВКЭ в пробах мозга лабораторных биопробных мышей				
		исходное заражение				1 пассаж
		смесь ДВ и Сиб	ДВ	Сиб	отрицательные	смесь ДВ и Сиб
Патогенные гомогенаты клещей						
Смесь ДВ- и Сиб-типов	14/16 87,5±8,5	12	1	1	0	14
Монотип ДВ	1/16 6,3±6,3	0	1	0	0	1
ОТ-ПЦР – отрицательные	1/16 6,3±6,3	1	0	0	0	1
В с е г о ...	16	13/16 81,3±10,1	2/16 12,5±8,5	1/16 6,3±6,3	0/16 0	16/16 100%
Апатогенные гомогенаты клещей						
Смесь ДВ- и Сиб-типов	8/94 8,5±2,9	1	0	3	4	Н.и.
Монотип ДВ	15/94 16,0±3,8	0	1	1	13	Н.и.
Монотип Сиб	1/94 1,1±1,1	0	0	1	0	Н.и.
ОТ-ПЦР – отрицательные	70/94 74, ±4,5	0	0	3	67	Н.и.
В с е г о ...	94	1/94 1,1±1,1	1/94 1,1±1,1	8/94 8,5±2,9	84/94 89,4±3,2	Н.и.
Апатогенные гомогенаты органов мелких млекопитающих						
Смесь ДВ- и Сиб-типов	17/130 13,1±3,0	0	1	7	9	Н.и.
Монотип ДВ	30/130 23,1±3,7	0	5	5	20	Н.и.
Монотип Сиб	12/130 9,2±2,5	0	1	3	8	Н.и.
ОТ-ПЦР – отрицательные	71/130 54,6±4,4	0	3	7	61	Н.и.
В с е г о ...	130	0/130 0	10/130 8,7±2,5	22/130 16,9±3,3	98/130 75,3±3,8	Н.и.

Примечание. ¹X – абсолютное количество изолятов, содержащих РНК ВКЭ указанного генетического субтипа среди всех исследованных (n); ²(A±m): A – процент изолятов с ВКЭ указанного субтипа среди всех исследованных, m – статистическая погрешность (в %).

1,4 -2,6 мг, у нимф – 15,9–16,5 мг [4, 16]. Следовательно, при питании личинки могут быть инфицированы кровью мелких грызунов, содержащей до 624 молекул РНК ДВ-типа ВКЭ, нимфы – до 3960. Для Сиб-типа количества в 1000 раз меньше, поэтому возможно попадание лишь единичных геномных РНК как в личинки, так и в нимфы. Теоретическая возможность передачи ВКЭ разных типов с кровью диких грызунов неполовозрелым клещам подтверждает их резервуарную роль.

Изменения соотношений генетических типов при адаптациях к лабораторным мышам. Комплексное

(внутриголовное и подкожное) инфицирование новорожденных лабораторных мышей ICR гомогенатами клещей или органов диких мелких млекопитающих, содержащих ВКЭ, приводило к изменениям исходного генетического состава ВКЭ (табл. 4). При этом смешанный состав патогенных изолятов ВКЭ после введения в мозг лабораторным мышам изменялся в единичных случаях. В то же время апатогенные изоляты вирусной РНК, полученные из клещей и органов млекопитающих, претерпевали существенную трансформацию генетической структуры с изменением, исчезновением исходных типов

или даже появлением в мозге клинически здоровых мышей. Обращает на себя внимание одинаковый характер изменений исходного генетического состава апатогенного ВКЭ из клещей и органов млекопитающих – снижается доля образцов с РНК ВКЭ ДВ-типа и инфицированных смесью РНК двух типов, но увеличивается относительное количество образцов, содержащих моноинфекцию РНК ВКЭ Сиб-типа (см. табл. 4).

Заключение

Вирусоносительство у диких мелких млекопитающих существенно превышало вирусофорность среди иксодовых клещей. В отличие от клещей в гомогенатах органов и крови млекопитающих, содержащих РНК и/или белок Е ВКЭ, патогенный для лабораторных мышей вирус выявлен только у единичных особей.

Молекулярно-генетический анализ показал, что на территории Новосибирской области среди клещей и мелких млекопитающих циркулируют 3 основных типа ВКЭ – дальневосточный, сибирский и европейский в моно- или политиповой форме.

Среди инфицированных клещей преобладал сибирский тип ВКЭ ($p < 0,01$), у диких мелких млекопитающих – дальневосточный тип ($p < 0,001$).

Исходный генетический состав изолятов ВКЭ от резервуарных хозяев претерпевал изменения в организме инфицированных лабораторных мышечесосунков в зависимости от патогенности. При минимальных генетических перестройках патогенных изолятов ВКЭ трансформация апатогенных изолятов была значительной.

Работа при финансовой поддержке Президиума СО РАН (Междисциплинарные интеграционные проекты фундаментальных исследований № 83 и № 135).

ЛИТЕРАТУРА

1. Злобин В.И., Демина Т.В., Мамаев Л.В., Бутина Т.В. Анализ генетической variability штаммов вируса клещевого энцефалита по первичной структуре фрагмента гена белка оболочки Е. *Вопросы вирусологии*. 2001; 1: 13–6.
2. Локтев В.Б. Вирус клещевого энцефалита, генетические особенности и его изменчивость в современном мире. *Бюллетень Сибирского отделения РАМН*. 2007; 4: 14–21.
3. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 2003; 57 (1–2): 129–46.
4. Филиппова Н.А. *Таежный клещ Ixodes persulcatus Schulze (Acarina, Ixodidae): морфология, систематика, экология, медицинское значение*. Л.: Наука; 1985.
5. Якименко В.В., Малькова М.Г., Шпынов С.Н. *Иксодовые клещи Западной Сибири: Фауна, экология, основные методы исследования*. Омск: ООО ИЦ «Омский научный вестник»; 2013.
6. Панов В.В. Мелкие млекопитающие лесопарковой зоны ННЦ – прокормители преимагинальных фаз таежного клеща. В кн.: Власов В.В., Репин В.Е., ред. *Инфекции, передаваемые клещами в сибирском регионе*. Новосибирск: СО РАН; 2011: 35–50.
7. Bakhvalova V.N., Dobrotvorskyy A.K., Panov V.V., Matveeva V.A., Tkachev S.E., Morozova O.V. Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonot. Dis.* 2006; 6 (1): 32–41.
8. Дерябин П.Г., Лебедева Г.А., Логинова Н.В. Реакция нейтрализации тогавирусов на мышах и культурах клеток. В кн.: *Арбовирусы (методы лабораторных и полевых исследований)* / Под ред. С.Я. Гайдамович. М.: Наука; 1986: 120–6.
9. Clarke D.H., Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1958; 7 (5): 561–73.
10. Морозова О.В., Гришечкин А.Е., Бахвалова В.Н., Исаева Е.И., Подчерняева Р.Я. Динамика репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток. *Вопросы вирусологии*. 2012; 2: 40–3.
11. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evolut.* 2013; 30: 2725–9.
12. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высшая школа; 1980.
13. Bakhvalova V.N., Panov V.V., Morozova O.V. Tick-borne encephalitis virus quasispecies rearrangements in ticks and mammals. In: *Flavivirus Encephalitis* / Ed. D. Růžek). Available at: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/tick-borne-encephalitis-virus-quasispecies-rearrangements-in-ticks-and-mammals>.
14. Чичерина Г.С., Морозова О.В., Панов В.В., Романенко В.Н., Бахвалов С.А., Бахвалова В.Н. Сравнительный анализ зараженности голодных иксодовых клещей *Ixodes pavlovskyi* Pomerantsev 1946 и *Ixodes persulcatus* Schulze вирусом клещевого энцефалита в зоне симпатрии их ареалов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20 (1): 20–6.
15. Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. *Хронический клещевой энцефалит*. Новосибирск: Наука; 1986.
16. Балашов Ю.С. *Иксодовые клещи – паразиты и переносчики инфекций*. СПб.: Наука; 1998.

Поступила 20.03.15

REFERENCES

1. Zlobin V.I., Demina T.V., Mamaev L.V., Butina T.V., Belikov S.I., Gorin O.Z. et al Analysis of genetic variability of strains of tick-borne encephalitis virus by primary structure of a fragment of the membrane protein E gene. *Voprosy virusologii*. 2001; 1: 12–6. (in Russian)
2. Loktev V.B. Tick-borne encephalitis virus, its genetic features and variability in the modern world. *Byulleten' Sibirskogo ot-deleniya RAMN*. 2007; 4: 14–21. (in Russian)
3. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 2003; 57 (1–2): 129–46.
4. Filippova N.A. *Taiga Tick Ixodes Persulcatus Schulze (Acarina, Ixodidae): Morphology, Systematics, Ecology, Medical Importance*. [Taizhnyy kleshch Ixodes Persulcatus Schulze (Acarina, Ixodidae): morfologiya, sistematika, ekologiya, meditsinskoe znachenie]. Leningrad: Nauka; 1985. (in Russian)
5. Yakimenko V.V., Mal'kova M.G., Shpynov S.N. *Ixodid Ticks of the Western Siberia: Fauna, Ecology, Main Research Methods*. [Iksodovye kleshchi Zapadnoy Sibiri: fauna, ekologiya, osnovnye metody issledovaniya]. Omsk: OOO ITs «Omskiy nauchnyy vestnik»; 2013. (in Russian)
6. Panov V.V. Small mammals of forest recreation zone of Novosibirsk Scientific Center – as natural hosts of immature taiga ticks. In: Vlasov V.V., Repin V.E., eds. *Tick-borne Infections in Siberian Region*. [Infektsii, peredavaemye kleshchami v Sibirskom regione]. Novosibirsk: PH SB RAS; 2011: 35–50. (in Russian)
7. Bakhvalova V.N., Dobrotvorskyy A.K., Panov V.V., Matveeva V.A., Tkachev S.E., Morozova O.V. Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonot. Dis.* 2006; 6 (1): 32–41.
8. Deryabin P.G., Lebedeva G.A., Loginova N.V. Neutralization reaction of togaviruses in mice and tissue cultures. In: *Arboviruses (Methods of Laboratory and Field Research)*. [Arbovirysy (metody laboratornykh i polevykh issledovaniy)] / Ed. S. Ya. Gaydamovich. Moscow: Nauka; 1986: 120–6. (in Russian)
9. Clarke D.H., Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1958; 7 (5): 561–73.

10. Morozova O.V., Grishchkin A.E., Bakhvalova V.N., Isaeva E.I., Podchernyaeva R.Ya. Changes in the reproduction of tick-borne encephalitis virus in cell cultures. *Voprosy virusologii*. 2012; 57 (2): 40–3. (in Russian)
11. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30: 2725–9.
12. Lakin G.F. *Biometry. [Biometriya]*. Moscow: High School; 1980. (in Russian)
13. Bakhvalova V.N., Panov V.V., Morozova O.V. Tick-borne encephalitis virus quasispecies rearrangements in ticks and mammals. In: *Flavivirus Encephalitis* / Ed. D. Růžek). Available at: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/tick-borne-encephalitis-virus-quasispecies-rearrangements-in-ticks-and-mammals>.
14. Chicherina G.S., Morozova O.V., Panov V.V., Romanenko V.N., Bakhvalov S.A., Bakhvalova V.N. Comparative analysis of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection of unfed adult ixodid ticks *Ixodes pavlovsky* Pomerantsev 1946 and *Ixodes persulcatus* Schulze in the sympatria area of their natural habitats. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2015; 20 (1): 20–6. (in Russian)
15. Pogodina V.V., Frolova M.P., Erman B.A. *Chronic Tick-borne Encephalitis. [Khronicheskiy kleshchevoy entsefalit]*. Novosibirsk: Nauka; 1986. (in Russian)
16. Balashov Yu.S. *Ixodid Ticks – Parasites and Vectors of Diseases. [Iksodovye kleshchi – parazity i perenoschiki infektsiy]*. St. Petersburg: Nauka; 1998. (in Russian)

Received 20.03.15

Сведения об авторах:

Чичерина Галина Сергеевна, мл. науч. сотр. лаб. патологии насекомых, chicherinagalina@bk.ru; **Панов Виктор Васильевич**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. экологии сообществ позвоночных животных; **Глунов Виктор Вячеславович**, доктор биол. наук, зав. лаб. патологии насекомых, директор ФГБУН Институт систематики и экологии животных СО РАН, e-mail: skif@eco.nsc.ru; **Морозова Ольга Владимировна**, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. иммунологии, e-mail: omorozova2010@gmail.com

© КОЛПАКОВ С.Л., ЯКОВЛЕВ А.А., 2015

УДК 614.4:616.9-022-086.22

Колпаков С.Л., Яковлев А.А.

О МЕТОДОЛОГИИ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 690050, г. Владивосток, просп. Острякова, д. 2

Цель исследования – изучение методов оценки заболеваемости и разработка методики оценки эпидемиологической ситуации в субъекте РФ за календарный год. Условием объективной оценки является использование внешних критериев. Поэтому оценка той или иной административной территории проводится по распределению заболеваемости по отдельным субъектам Российской Федерации. В качестве критерия предлагается использовать среднюю заболеваемость субъекта РФ – медиану и ее доверительные границы с достоверностью 95%. Как инструмент градации оценочной шкалы рассматриваются как весь доверительный интервал, так и возможности перехода к центильному методу. Разработаны методические принципы оценки эпидемиологической ситуации. Основой является положение, что объективной в территориальном аспекте может быть оценка только роли стабильных факторов. На первом этапе оценивать эпидемическую обстановку следует по теоретической заболеваемости рассматриваемого года или по прогнозу. В последующем после проведения ретроспективного эпидемиологического анализа заболеваемости в субъекте и установления роли детерминант эпидемического процесса в показателе рассматриваемого года (внутренний контроль), можно провести корректировку и вновь оценить эпидемиологическую ситуацию.

Ключевые слова: оценка; заболеваемость; эпидемиологическая ситуация; эпидемиологический анализ; критерии.

Для цитирования: *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20 (4): 34–39.

Kolpakov S.L., Yakovlev A.A.

ABOUT ASSESSMENT OF THE METHODOLOGY OF THE EPIDEMIOLOGICAL SITUATION

Pacific State Medical University, 2, Ostryakov Avenue, Vladivostok, Russian Federation, 690002

Objective: the study of methods for the assessment of the prevalence and development of methodology for evaluation of the epidemiological situation in the RF subjects during the calendar year. The condition of an objective evaluation is the use of external criteria. Therefore, the assessment of one or another administrative territory is performing accordingly to the distribution of morbidity rate in separate subjects of the Russian Federation. As a criterion there is proposed to use the average prevalence of the subject of the Russian Federation - the median and its confidence limits with 95% significance. As a tool for grading of the scale there are considered as the total confidence interval, as possibilities of transition to centile method. There were elaborated methodical principles of the evaluation of the epidemiological situation. The base is the position that the objective, in territorial aspect may be the estimation only of the role of the stable factors. At the first stage the epidemiological situation should be to assessed on the theoretical prevalence of the year under consideration or on the forecast. Later, after the performing of the retrospective epidemiological analysis of morbidity in the subject and establishing the role of the determinants of the epidemic process in the index of considered year (internal control) it is possible to make adjustment and newly re-assess the epidemiological situation.

Key words: evaluation; morbidity; epidemiological situation; epidemiological analysis; criteria.

For citation: *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni*. 2015; 20(4): 34–39. (In Russ.)

Для корреспонденции: **Колпаков Сергей Леонидович**, канд. мед. наук, доцент, кафедра эпидемиологии и военной эпидемиологии, e-mail: kolpakovsl@mail.ru.