

- polymorpha yeast strain - producer of mutant hepatitis B virus surface antigen (versions). Patent RU № 2586513 C1.; 2016. (in Russian)
16. Bazhenov A.I., Konopleva M.V., El'gort D.A., Fel'dsherova A.A., Khats Yu.S., Godkov M.A., et al. Algorithm of serologic screening and assessment of prevalence of serologically meaningful mutations of HBsAg in hepatitis B virus carriers. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2007; (6): 30-7. (in Russian)
 17. Tijssen P., Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates enzyme immunoassays. *Anal. Biochem*. 1984; 136(2): 451-7.
 18. Krymskiy M.A., Borisov I.A., Yakovlev M.S., Mel'nikov V.A., Suslov A.P., Semenenko T.A., et al. A method of assessing the level of antibodies specific to various HBsAg of HBV. Patent RF № 2616236C1; 2017. (in Russian)
 19. Bellecave P., Gouttenoire J., Gajer M., Brass V., Koutsoudakis G., Blum H.E., et al. Hepatitis B and C virus coinfection: a novel model system reveals the absence of direct viral interference. *Hepatology*. 2009; 50(1): 46-55.

Поступила 18.02.17
Принята в печать 27.02.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 616.98:578.833.26]-078.33-092.9

Бахвалова В.Н.¹, Панов В.В.¹, Потапова О.Ф.¹, Морозова О.В.^{2,3}

ЦИТОКИНЫ И АНТИТЕЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ ДИКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ (RODENTIA) ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

¹ ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» Сибирского отделения РАН, 630091, г. Новосибирск;

² Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

³ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА России, 119435, г. Москва

Моделирование персистенции проводили посредством заражения диких грызунов красной полевки *Myodes rutilus* (Pallas, 1779) и полевой мыши *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771), а также лабораторных мышей вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) в составе клещевых суспензий с последующей детекцией вируса, антигемагглютининов и вируснейтрализующих антител к ВКЭ, а также экспрессии генов цитокинов в течение 4 мес. При высоких частотах детекции РНК и антигена Е ВКЭ на протяжении всего периода наблюдений патогенный для лабораторных мышей-сосунков вирус выделяли преимущественно до 8 сут после заражения. На поздних стадиях персistentной инфекции (1—4 мес) частота детекции вирусной РНК у красных полевок и лабораторных мышей оставалась высокой, а у полевых мышей значительно снижалась ($p < 0,001$). Вирусные нагрузки у диких грызунов достоверно превышали ($p < 0,001$) значения у лабораторных мышей. Средние частоты экспрессии генов Th2-цитокинов были сходными у *M. rutilus* (50 ± 8,5%) и *A. agrarius* (50 ± 9,6%) на протяжении всего периода, но частоты детекции мРНК цитокинов Th1-пути после активации транскрипции через 2 сут инфекции и последующего возвращения к исходному уровню различались ($p > 0,05$) у двух видов диких грызунов, составляя 22,2 ± 5 и 38,1 ± 7,6% соответственно. При этом доля особей с мРНК интерлейкина-1β была значимо ($p < 0,05$) больше у *A. agrarius*, чем у *M. rutilus*, что, возможно, обуславливало пониженные частоты вирусносительства среди полевых мышей по сравнению с красными полемками. Антигемагглютинины и вируснейтрализующие антитела у диких грызунов были выявлены через 30 сут после заражения и оставались в детектируемых количествах до 4 мес. Таким образом, персистенция ВКЭ у мелких грызунов сопровождалась детекцией патогенного вируса в ранний период, вирусной РНК и антигена Е в течение 4 мес с большими вирусными нагрузками у диких грызунов, превышающими значения у лабораторных мышей. Изменения экспрессии генов провоспалительных цитокинов и наличие вирусспецифических антител свидетельствовали об иммуномодулировании как возможном механизме персистенции.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; красная полевка *Myodes rutilus* (Pallas, 1779); полевая мышь *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771); цитокины; вируснейтрализующие антитела и антигемагглютинины.

Для цитирования: Бахвалова В.Н., Панов В.В., Потапова О.Ф., Морозова О.В. Цитокины и антитела при экспериментальном заражении диких и лабораторных мелких грызунов (Rodentia) вирусом клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(4): 186-192.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-186-192>

Bakhvalova V.N.¹, Panov V.V.¹, Potapova O.F.¹, Morozova O.V.^{2,3}

CYTOKINES AND ANTIBODIES IN EXPERIMENTAL INFECTION OF WILD AND LABORATORY RODENTS (RODENTIA) WITH TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

¹ Institute of Systematics and Ecology of Animals, Novosibirsk, 630091, Russian Federation;

² D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

³ Federal Research Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, 119435, Russian Federation

Для корреспонденции: Морозова Ольга Владимировна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии отдела арбовирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: omorozova2010@gmail.com

Persistence modeling was performed by means of infection of the wild rodents: northern red-backed vole *Myodes rutilus* (Pallas, 1779) and striped field mouse *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771), as well as of laboratory mice with the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in tick suspensions with subsequent detection of the TBEV, hemagglutination inhibition and virus-neutralizing antibodies, as well as expression of cytokine genes during 4 months. Detection rate of the TBEV RNA and antigen E remained high during the whole period of observations; however, virus pathogenic for laboratory suckling mice was isolated mainly during a period of 8 days post infection. At the late stages of the persistent infection (1-4 months) the TBEV RNA detection rate in northern red-backed voles and laboratory mice remained high, whereas in striped field mice it significantly declined ($p < 0.001$). The viral loads were significantly higher ($p < 0.001$) in the wild rodents compared to the laboratory mice. Average frequencies of Th2 cytokine gene expression were similar for *M. rutilus* ($50.0 \pm 8.5\%$) and *A. agrarius* ($50.0 \pm 9.6\%$) during the whole period, but Th1 cytokine mRNA detection rate after transcription activation in 2 days post infection and subsequent return to the original values were different ($22.2 \pm 5.0\%$ and $38.1 \pm 7.6\%$, respectively ($p > 0.05$)). Meanwhile, a part of animals with interleukin 1β mRNA was significantly higher among *A. agrarius* than among *M. rutilus* ($p < 0.05$), which might cause low levels of spontaneous TBEV infection of field mice compared to red voles. Hemagglutination inhibition and virus-neutralizing antibodies were revealed in wild rodents in 30 days post infection and remained at detectable levels during 4 months.

Thus, the TBEV persistence in small rodents was accompanied by the detection of the pathogenic virus in the early period, the viral RNA and antigen E during 4 months with high viral loads in wild animals exceeding the values in laboratory mice. Changes in the proinflammatory cytokine gene expression frequencies and the TBEV-specific antibodies pointed at immunomodulation as the possible mechanism of the TBEV persistence.

Key words: tick-borne encephalitis virus; Northern red-backed vole *Myodes rutilus* (Pallas, 1779); striped field mouse *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771); cytokines; virus-neutralizing and hemagglutination inhibition antibodies.

For citation: Bakhvalova V.N., Panov V.V., Potapova O.F., Morozova O.V. Cytokines and antibodies in experimental infection of wild and laboratory rodents (Rodentia) with tick-borne encephalitis virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(4): 186-192. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-186-192>

For correspondence: Olga V. Morozova, D. Sci., leading researcher, Laboratory of immunology, Department of Arboviruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: omorozova2010@gmail.com

Information about authors:

Bakhvalova V. N., <http://orcid.org/0000-0002-3441-1751>

Panov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-9728-2985>

Potapova O.F., <http://orcid.org/0000-0002-8435-7482>

Acknowledgments. This work was financially supported by the Integration programs of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences and Federal programs for Basic Scientific Research 2013-2020 (VI.51.1.5).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 19 January 2017

Accepted 28 February 2017

Введение

Известны 3 способа персистенции вирусов: снижение уровня репликации вирусных геномов и экспрессии вирусных генов с формированием нелитической инфекции; конформационные изменения вирусных белков, экспонированных на поверхности вирионов или зараженных клеток; вирусопосредованное модулирование иммунного ответа [1].

Персистенция ВКЭ среди многочисленных и разнообразных эволюционно удаленных позвоночных и беспозвоночных хозяев обеспечивает стабильность всей паразитарной системы. Совпадение сезонных циклов активности и биотопов иксодовых клещей и их прокормителей, врожденная резистентность и специфический иммунитет определяют роли разных видов мелких млекопитающих как прокормителей личинок и нимф клещей, а также резервуарных, индикаторных и случайных хозяев ВКЭ [2, 3]. В отличие от резервуарных хозяев с пожизненным вирусоносительством и доказанной передачей ВКЭ клещам для индикаторных хозяев характерны короткий период виремии с низкими уровнями вирусной репродукции и неспособностью передавать ВКЭ переносчикам [2]. Случайные хозяева не могут поддерживать ни репликацию геномной вирусной РНК из-за отсутствия клеточных факторов, ни передачу ВКЭ [2].

Персистенция ВКЭ в инфицированных клетках происходит в присутствии в организме специфических антител, в том числе вируснейтрализующих и ингибирующих геммаглотинацию [4–6]. Такие антитела не могут быть утрачены у млекопитающих через несколько месяцев, как полагают Коренберг и соавт. [3], после клональной селекции В-клеток,

секретирующих специфические антитела, возможно лишь снижение титров ниже пределов чувствительности серологических методов. Поэтому в исследованиях персистентной инфекции необходимо использование комплексного подхода, включая молекулярно-биологические методы, так как их специфичность и чувствительность превосходят пределы иммунологических подходов, на которых были основаны прежние выводы, в частности Коренберга и соавт. [3].

Цель данной работы состояла в сравнительном анализе врожденной резистентности и адаптивного иммунитета у массовых видов диких грызунов: красной полевки *Myodes rutilus* Pallas и полевой мыши *Apodemus agrarius* Pallas, а также у лабораторных мышей ICR после их экспериментального заражения ВКЭ в составе клещевых суспензий.

Материал и методы

Мелкие млекопитающие и клещи. Голодных имаго иксодовых клещей и диких мелких млекопитающих отлавливали на территории антропоургического очага клещевого энцефалита (КЭ) г. Новосибирска ($54^{\circ}49' N$, $83^{\circ}05' E$). Имаго голодных иксодовых клещей собирали на флаг с растительности в период их максимальной активности в мае—июне 2010 г. с определением видов по морфологическим признакам [7]. Диких животных для опытов отлавливали в октябре с использованием живоловок, определение вида, пола и возраста проводили, как описано ранее [8]. Молодых неразмножавшихся зверьков (возраст 3–4 нед) помещали на неделю в индивидуальные клетки после обработки 1% водной эмульсией циперметрина для уничтожения эктопаразитов. Через 1 мес

после содержания в индивидуальных клетках у животных прижизненно брали кровь для определения РНК ВКЭ, антигеммагглютининов и вируснейтрализующих антител к ВКЭ, после чего для опытов отбирали неинфицированных особей. Всего в опытах использовали 65 особей красной полевки и 54 особи полевой мыши, а также 57 лабораторных мышей ICR аналогичного с дикими зверьками возраста.

Детекцию ВКЭ проводили с использованием комплекса методов: обратной транскрипции с последующей ПЦР с генотипспецифичными флуоресцентными зондами в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ), иммуноферментного анализа (ИФА) для определения антигена Е ВКЭ с использованием набора ВектоВКЭ-антиген-стрип (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) и биопробы на 1—3- или 10—12-суточных лабораторных мышях ICR [9—11]. Патогенность изолятов оценивали для 1—3-суточных лабораторных мышей ICR в соответствии с описанием в работе [10].

Вирусную нагрузку определяли с использованием количественной ОТ-ПЦР-РВ с калибровочным графиком зависимости пороговых циклов (Ct) флуоресценции от количества геном-эквивалентов рекомбинантной плазмиды, содержащей клонированную полноразмерную ДНК-копию генома ВКЭ, и уравнения Лукьянова—Матца [11].

Для заражения животных готовили смесь равных аликвот (по 0,4 мл) супернатантов суспензий 27 вирусосодержащих пулов клещей (по 10 экземпляров в каждом пуле), затем приготовленную смесь развели в 5 раз физиологическим раствором (0,9% NaCl) с добавлением 3% сыворотки новорожденных телят. Молекулярное типирование посредством ОТ-ПЦР-РВ с генотипспецифичными зондами и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *E* и *NS1* выявили в смеси РНК ВКЭ дальневосточного и сибирского (подтипы Заусаев и Васильченко в соотношении 4:1) генетических типов, доминирующих на территории Сибири [10]. По данным количественной ОТ-ПЦР-РВ, смесь клещевых суспензий содержала приблизительно 2520 геном-эквивалентов в 1 мл каждого типа ВКЭ, а в сумме — 5040 геном-эквивалентов ВКЭ в 1 мл. Внутримозговое титрование на 14-суточных лабораторных мышях ICR показало, что инфекционный титр ВКЭ в смеси составлял 3,5 lg LD₅₀/мл.

Равные аликвоты (по 0,4 мл) супернатантов суспензий 27 неинфицированных пулов клещей без дополнительного разведения физиологическим раствором объединяли в безвирусную смесь клещевых суспензий.

Заражение красных полевок, полевых и лабораторных мышей проводили посредством подкожного введения 0,25 мл смеси клещевых суспензий, содержащих 2,9 lg LD₅₀ ВКЭ и 1260 геном-эквивалентов ВКЭ. Контрольным группам лабораторных мышей вводили подкожно по 0,25 мл физиологического раствора (0,9% NaCl) с добавлением 3% сыворотки новорожденных телят или по 0,25 мл безвирусной смеси клещевых суспензий.

Образцы крови для детекции ВКЭ и антител к ВКЭ брали прижизненно из ретроорбитального венозного сплетения до заражения и через 2, 4, 8, 16, 30, 60, 90 и 120 сут после заражения животных. Образцы крови для детекции ВКЭ хранили аликвотами по 50 мкл при -70 °С. В пробирки с кровью для выделения РНК добавляли 3 объема лизирующего раствора, содержащего 5,5 М гуанидин-изотиоцианат. Гомогенаты крови исследовали индивидуально. Пробы крови для тестирования антител к ВКЭ центрифугировали для отделения сыворотки, которую хранили в холодильнике при 4 °С не более недели.

Анализ экспрессии генов цитокинов у мышей и диких грызунов. Экспрессию генов цитокинов у инфицированных ВКЭ мелких грызунов исследовали посредством ОТ-ПЦР с праймерами, соответствующими мРНК интерферона γ (ИФН- γ), фактора некроза опухоли α (ФНО α), интерлейкинов (ИЛ) 4, 6, 10, 12 и 1 β для суммарных РНК, выделенных из клеток по-

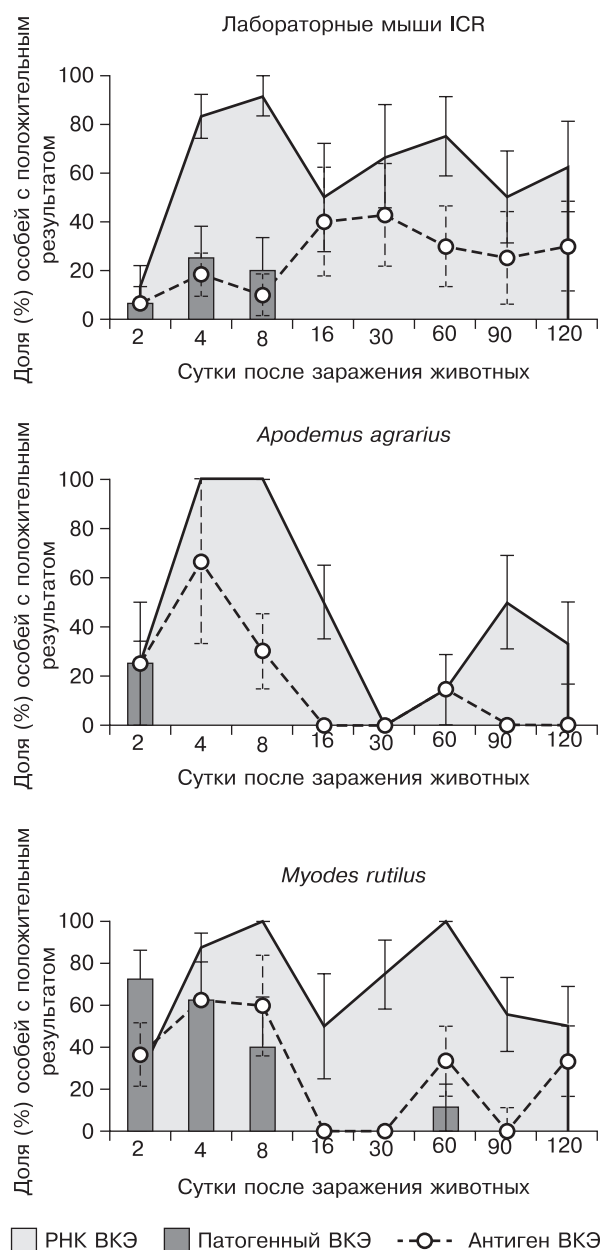


Рис. 1. Частоты детекции РНК, белка Е и патогенного ВКЭ в крови диких и лабораторных мелких грызунов после заражения вирусосодержащей клещевой суспензией.

сле свертывания 100 мкл крови мышей, с электрофоретической детекцией продуктов реакций, как описано ранее [12].

Вирусспецифичные антитела в крови животных определяли с помощью реакции торможения геммагглютинации (РТГА) с гусиными эритроцитами [13] и реакции биологической нейтрализации (РН) [14] с использованием мышей ICR массой 8—10 г, разведения сывороток 1:10 и 100 LD₅₀ штамма ВКЭ 2689 (номер доступа в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) JQ693478).

Статистическое сравнение выборочных долей и абсолютных количеств проводили с использованием критерия Стьюдента, принят уровень значимости различий $p < 0,05$. В тексте и таблицах для выборочных долей приведены ошибки репрезентативности [15].

Работу с инфекционным ВКЭ и потенциально опасным материалом выполняли в лаборатории, аттестован-

Таблица 1

Усредненные частоты детекции РНК ВКЭ в пробах крови мелких грызунов в ранний и поздний периоды инфекции после дозированного заражения вирусофорной клещевой суспензией

Вид животных	Частоты детекции РНК ВКЭ в крови, %	
	ранний период (2—16 сут)	поздний период (1—4 мес)
Лабораторные мыши ICR	52,4 ± 6,3	56,7 ± 9,2
Красная полевка	61,8 ± 5,6	70,6 ± 7,9
Полевая мышь	70,0 ± 6,0*	26,7 ± 8,2*

Примечание. * — статистически значимые различия ($p < 0,001$) между частотами детекции РНК ВКЭ у полевой мыши в ранний и поздний периоды.

ной для работы с патогенами II 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 12.08.1977 № 755).

Результаты

Подкожное дозированное заражение красной полевки *M. rutilus* и полевой мыши *A. agrarius* смесью суспензий клещей, спонтанно инфицированных сибирским и дальневосточным типами ВКЭ, проводили для моделирования персистенции ВКЭ у адаптированных резервуарных хозяев [10]. Контрольная группа включала неадаптированных к вирусу лабораторных мышей ICR. После заражения у животных не отмечали клинических проявлений КЭ в течение всего периода наблюдений. Однако в крови большинства инфицированных грызунов были выявлены вирусная РНК посредством ОТ-ПЦР-РВ и антиген ВКЭ (титры до 1:20 в ИФА) (рис. 1).

При этом у лабораторных мышей ICR и красных полевок частоты детекции вирусной РНК оставались высокими в ранний и поздний периоды инфекции, составляя в среднем у мышей ICR $52,4 \pm 6,3$ и $56,7 \pm 9,2\%$ соответственно, у красной полевки — $61,8 \pm 5,6$ и $70,6 \pm 7,9\%$ особой соответственно. У полевой мыши в отличие от красной полевки и мышей ICR в поздний период отмечено значимое ($p < 0,001$) снижение доли образцов, содержащих РНК ВКЭ, — от $70 \pm 6,0\%$ в ранний период до $26,7 \pm 9,2\%$ — в поздний (табл. 1).

Количественные оценки вирусных нагрузок на основании величин пороговых циклов в ОТ-ПЦР-РВ показали, что у лабораторных мышей ICR максимальные значения достигали $2,5 \cdot 10^5$ геномов ВКЭ в 1 мл крови через 2—4 сут после заражения и постепенно снижались до 100 копий РНК в 1 мл к 16-му дню инфекции. Вирусные нагрузки в крови диких грызунов до $5,7 \cdot 10^9$ геном-эквивалентов в 1 мл через 2 сут и от 100 до $3,1 \cdot 10^7$ геном-эквивалентов в 1 мл на протяжении 4 мес экспериментальной инфекции без признаков заболевания значительно превышали ($p < 0,001$) значения для лабораторных животных, что может быть следствием взаимной адаптации ВКЭ и диких мелких грызунов.

Патогенный для лабораторных мышей-сосунков вирус выделяли из крови всех видов грызунов преимущественно в ранней стадии инфекции до 8 сут после заражения (см. рис. 1): у красной полевки — в $66,6 \pm 5,6\%$ проб (на 2, 8 и 60-е сутки), у полевой мыши — в $15 \pm 7,4\%$ проб и только на 2-е сутки, у ICR — в $16,2 \pm 6,1\%$. При этом инфекционные титры вируса (для мышей ICR массой 8—10 г при внутримозговом заражении) достигали в образцах красной полевки $5,5 \lg LD_{50}$, а у полевой мыши — менее $2 \lg LD_{50}$.

Частота экспрессии генов Th1-цитокинов до заражения составляла у полевой мыши $33,3 \pm 11,4\%$, у красной полевки значимо ($p < 0,05$) меньше — $6,3 \pm 6,3\%$ (рис. 2, а). Через 2 сут после заражения суммарная частота детекции мРНК ИФН- γ , ФНО α и ИЛ-12, обеспечивающих развитие преимущественно клеточного иммунного ответа, у полевой мыши возрастала до $50 \pm 15,1\%$ ($p > 0,05$), у красной полевки — до $56,3 \pm 12,8\%$ ($p < 0,05$). В поздней стадии (через 2 мес после заражения) частота экспрессии генов Th1-цитокинов снизилась у красной полевки до $22,2 \pm 5,0\%$ ($p < 0,05$), у полевой мыши — до $38,1 \pm 7,6\%$ ($p > 0,05$) (см. рис. 2, а). При этом у последней выявлено статистически значимое

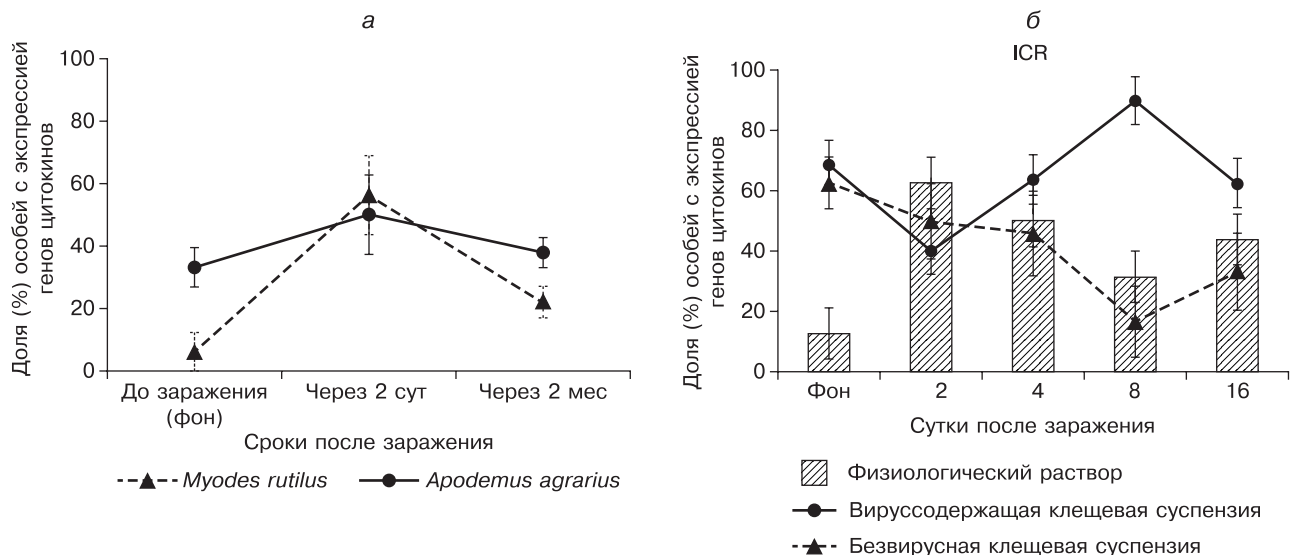


Рис. 2. Динамика частот экспрессии генов цитокинов Th1-пути: у двух видов диких грызунов после введения смеси клещевых суспензий, содержащих ВКЭ (а); у лабораторных мышей ICR после введения физиологического раствора или клещевых суспензий, содержащих и не содержащих ВКЭ (б).

Таблица 2

Экспрессия генов цитокинов у диких грызунов через 60 сут после дозированного заражения клещевой суспензией, содержащей ВКЭ

Вид животных	Частоты детекции РНК цитокинов в крови, %						
	Th1-путь — цитокины преимущественно клеточного иммунного ответа				Th2-путь — цитокины преимущественно гуморального иммунного ответа		
	ИЛ-1β	ИЛ-12	ИФН-γ	всего**	ИЛ-4	ИЛ-10	всего**
<i>Myodes rutilus</i>	22,2 ± 10,1*	22,2 ± 10,1	22,2 ± 10,1	22,2 ± 5,0	22,2 ± 10,1	77,8 ± 10,1	50,0 ± 8,5
<i>Apodemus agrarius</i>	57,1 ± 13,7*	28,6 ± 12,5	28,6 ± 12,5	38,1 ± 7,6	28,6 ± 12,5	71,4 ± 12,5	50,0 ± 9,6

Примечание. * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия между частотой детекции ИЛ-1β у красной полевки и полевой мыши; ** — усредненное количество положительных результатов для цитокинов клеточного или гуморального иммунного ответа.

($p < 0,05$) превалирование доли особей с экспрессией гена ИЛ-1β (табл. 2).

Частоты экспрессии генов Th2-цитокинов, обеспечивающих развитие преимущественно гуморального иммунного ответа, были статистически сходными у разных видов диких мелких грызунов на протяжении всего периода наблюдений, составляя до заражения у полевой мыши $62,5 \pm 12,5\%$ особей, у красной полевки — $40,9 \pm 10,7\%$, через 2 мес после заражения у красной полевки — $50 \pm 8,5\%$, у полевой мыши — $50 \pm 9,6\%$ (см. табл. 2).

Экспрессию генов цитокинов у лабораторных мышей ICR исследовали в ранний период после подкожного введения вирусосодержащей и безвирусной клещевых суспензий спонтанно инфицированных клещей, а также физиологического раствора (рис. 2, б). Различия частот определения РНК цитокинов преимущественно клеточного иммунитета у лабораторных и диких грызунов после введения вирусосодержащей суспензии состояли в их активации у диких грызунов через 2 сут инфекции и, напротив, относительном ингибировании у мышей ICR (см. рис. 2, а, б). Показана супрессия генов цитокинов клещевыми суспензиями без ВКЭ в ранних стадиях инфекции до 8 сут после заражения с возможным подавлением специфического клеточного иммунитета, что необходимо для формирования последующей персистенции ВКЭ. При этом снижение частот детекции цитокинов после введения вирусосодержащей суспензии было более кратковременным — до 2 сут. Необходимо отметить сходное увеличение частот детекции цитокинов Th1-пути через 2 сут у лабораторных мышей после введения физиологического раствора и у диких грызунов после заражения вирусосодержащими клещевыми суспензиями с последующим снижением до фоновых значений (см. рис. 2, а, б), что могло быть обусловлено адаптированностью резервуарных хозяев к ВКЭ. Для противовоспалительных регуляторных интерлейкинов (ИЛ-4 и ИЛ-10) отмечена одновременная активация без иммуносупрессии с максимумом через 4 дня после заражения и последующим снижением до фоновых значений через 16 сут инфекции, что, возможно, обеспечивало последующую индукцию гуморального иммунитета [16—18]. Таким образом, в ранней стадии инфекции лабораторных мышей клещевыми суспензиями, содержащими ВКЭ, происходила индукция транскрипции РНК цитокинов преимущественно гуморального иммунитета

с подавлением экспрессии генов цитокинов Th1.

Вируснейтрализующие антитела у всех видов мелких грызунов, антигемагглютинины к ВКЭ у диких животных были обнаружены через 30 сут и оставались в детектируемых количествах до 4 мес инфекции (рис. 3). В отличие от диких зверьков у мышей ICR антигемагглютинины появились раньше — на 8-е сутки. Средняя геометрическая титров антигемагглютининов для серопозитивных особей за весь период составляла у красной полевки 54, у полевой мыши — 23,8, у мышей ICR через 8—16 сут — 61.

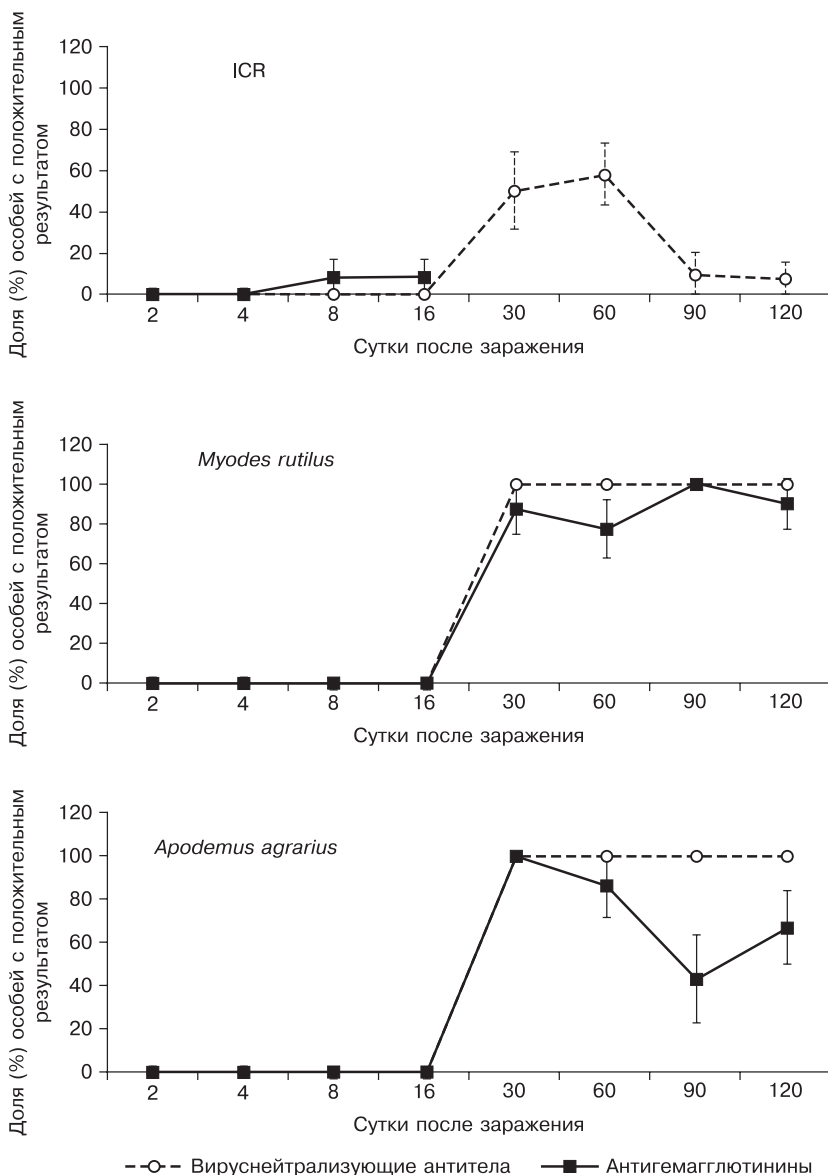


Рис. 3. Частоты выявления вируснейтрализующих и подавляющих гемагглютинацию антител к ВКЭ у мелких грызунов после заражения вирусосодержащими клещевыми суспензиями.

Антигемагглютинины у мышей ICR в период 30—120 сут после заражения не исследовали.

Обсуждение

Моделирование персистентной инфекции у лабораторных мышей и массовых видов диких грызунов — основных прокормителей преимагинальных фаз иксодовых клещей — красной полевки *M. rutilus* и полевой мыши *A. agrarius* [8—10] осуществляли посредством дозированного подкожного заражения смесью суспензий спонтанно инфицированных клещей двух видов, доминирующих на исследуемой территории, — *Ixodes persulcatus* P. Schulze, 1930, и *Ixodes pavlovskyi* Pomerantsev, 1946 (со значительным преваляированием ($p < 0,001$) доли последнего — в среднем $70,8 \pm 0,7\%$) [10], спонтанно инфицированных сибирским и дальневосточным генетическими типами ВКЭ.

Заражение животных смесью генетических типов ВКЭ обусловлено высокими частотами смешанных инфекций у клещей и млекопитающих на территории Новосибирской области [10, 19]. Доза заражения $2,9 \lg LD_{50}$ ВКЭ соответствовала инфекционным титрам ВКЭ у имаго иксодовых клещей при спонтанном инфицировании в природной популяции [10]. Применение комплекса высокочувствительных и специфичных молекулярно-биологических и вирусологических методов позволило выявить РНК и белок Е ВКЭ у большинства инфицированных диких и лабораторных грызунов в течение 4 мес при отсутствии признаков КЭ (учащенное дыхание, тремор конечностей, спазмы, парезы и параличи с летальными исходами через несколько часов), а патогенный для лабораторных мышей-сосунков ВКЭ — преимущественно на ранних стадиях инфекции до 8 сут после заражения. Вирусные нагрузки у диких грызунов через 2 сут после экспериментального заражения превышали средние количества ВКЭ при спонтанном вирусносительстве у диких грызунов [10] и экспериментальной инфекции лабораторных мышей. Ранее [20] у большинства особей красной полевки и полевой мыши через 2—3 сут после экспериментального подкожного заражения ВКЭ определяли эпизоотически значимую вирусемию с титрами $3 \lg LD_{50,0,03}$ и более [21] для лабораторных мышей. При этом у красной полевки такой уровень вирусемии развивался при инфекции высоко- и умеренновирulentными штаммами (титры при подкожном заражении мышей 7 и $5,2 \lg LD_{50}$ соответственно), у полевой мыши — умеренно- и слабовирulentными штаммами (титры 5,2 и $3,5 \lg LD_{50}$ соответственно). В совокупности данные подтверждают роль красной полевки и полевой мыши как резервуарных, а не индикаторных хозяев ВКЭ, несмотря на существенные различия в частотах вирусносительства, вызванные, возможно, их приуроченностью к разным биотопам [8—10, 19], — в природных популяциях красная полевка, как и иксодовые клещи, обитает в лесных биотопах, а полевая мышь — на более открытых пространствах [8] с меньшей численностью таежного клеща, для развития которого необходима влажность лесной подстилки. Пониженные частоты вирусносительства у полевой мыши по сравнению с красной полевкой как в эксперименте на поздних стадиях персистенции (см. табл. 1 и рис. 1), так и в естественных условиях в природных популяциях [9, 10, 19] могут быть обусловлены различиями врожденной резистентности. Иммуная реактивность *A. agrarius* также была выше по сравнению с *M. rutilus* [22, 23].

До заражения и после 2 мес персистенции ВКЭ частоты детекции мРНК цитокинов Т-хелперного ответа 1-го типа у полевой мыши превышали таковые у красной полевки при сходных уровнях экспрессии генов цитокинов Th2-пути. Статистически значимое ($p < 0,05$) преваляирование доли особей с экспрессией гена ИЛ-1 β , возможно, обусловило пониженные частоты вирусносительства у полевой мыши по сравнению с красной полевкой в период персистенции как в эксперименте (см. табл. 1 и рис. 1), так и в естественных условиях у спонтанно инфицированных зверьков [9, 10, 19]. Подавление экспрессии генов цитокинов смесью безвирус-

ных клещевых суспензий (см. рис. 2, б), возможно, обусловлено иммуносупрессивными свойствами слюны клещей [24]. Различия в динамике изменения частот детекции РНК цитокинов при введении смеси клещевых суспензий, содержащих и не содержащих ВКЭ, могли быть вызваны разведением вирусосодержащей смеси в 5 раз физиологическим раствором для достижения наиболее распространенных в природных популяциях титров вируса.

Персистенция ВКЭ у мелких грызунов происходила после индукции экспрессии генов ИЛ-4 и ИЛ-10 Th2-пути преимущественно гуморального иммунного ответа в присутствии вируснейтрализующих и ингибирующих гемагглютинацию антител, возможно, вследствие внутриклеточной локализации адаптированного к грызунам вируса, а также внеклеточной секреции и циркуляции антител.

Заключение

При экспериментальном моделировании персистенции ВКЭ посредством подкожного заражения диких мелких грызунов смесью суспензий клещей, спонтанно инфицированных сибирским и дальневосточным типами вируса, количественные оценки показали высокие вирусные нагрузки до 1000 вирусных частиц на ядерную клетку крови в присутствии специфических антител, что исключает ингибирование репликации геномных РНК или экспрессии генов ВКЭ. Поверхностный антиген Е ВКЭ и вирусспецифические антигена способны к перекрестным иммунологическим реакциям в тест-системах с моноклональными антителами и эталонными штаммами вируса соответственно [9], что может свидетельствовать о конформационной стабильности вирусных антигенов. Следовательно, в качестве возможного механизма персистенции ВКЭ у диких и лабораторных грызунов остается принять третий из вышеперечисленных способов [1] — вирусопосредованное модулирование иммунного ответа, о чем свидетельствовал дисбаланс провоспалительных цитокинов и, следовательно, возможные нарушения клеточного иммунитета.

Финансирование. Исследования выполнены при финансовой поддержке грантов № 83, 135, интеграционных программ Сибирского отделения РАН и Федеральных программ фундаментальных научных исследований 2013-2020 (VI.51.1.5).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 9, 13, 18 см. REFERENCES)

- Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. *Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами*. М.: Наука; 2013.
- Верета Л.А. *Иммунология клещевого энцефалита по материалам экспериментальных и клинико-эпидемиологических исследований в очагах Приамурья*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.: 1969.
- Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. *Хронический клещевой энцефалит*. Новосибирск: Наука; 1986.
- Бахвалова В.Н., Панов В.В., Потапова О.Ф., Матвеева В.А., Матвеев Л.Э., Морозова О.В. Персистенция вируса клещевого энцефалита в организме диких мелких млекопитающих и в культурах перmissiveклеток. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2007; (11): 79-86.
- Филиппова Н.А. Систематика и эволюция. В кн. Филиппова Н.А., ред. *Таежный клещ Ixodes persulcatus Schulze (Acarina, Ixodidae): морфология, систематика, экология, медицинское значение*. Ленинград: Наука; 1985: 97-187.
- 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: Сибирское отделение Российской академии наук; 2011: 35-50.
- Бахвалова В.Н., Чичерина Г.С., Панов В.В., Глулов В.В., Морозова О.В. Биоразнообразие вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах и мелких млекопитающих на территории Новосибирской обл. *Инфекционные болезни*. 2015; 13(4): 15-21.

11. 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; 57(2): 40-3.
12. Морозова О.В., Бахвалова В.Н., Чичерина Г.С., Потапова О.Ф., Исаева Е.И. Сравнение экспрессии генов цитокинов у мышей, иммунизированных или зараженных вирусом клещевого энцефалита. В кн. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., ред. *Интерферон – 2011. Сборник научных статей к 80-летию академика РАНН Ф.И. Ершова*. М.: 2012: 461-5.
14. Дерябин П.Г., Лебедева Г.А., Логинова Н.В. Реакция нейтрализации тогавирусов на мышцах и культурах клеток. В кн.: Гайдамович С.Я., ред. *Арбовирусы (методы лабораторных и полевых исследований)*. М.: Наука; 1986: 120-6.
15. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высшая школа; 1980.
16. Сартакова М.Л., Коненков В.И. Структурные основы межклеточных взаимодействий в процессе представления антигена Т-лимфоцитам: молекулы главного комплекса гистосовместимости, как одна из составляющих частей тримолекулярного комплекса. *Успехи современной биологии*. 1997; 117(5): 568-83.
17. Игнат'ев Г.М., Отрашевская Е.В., Воробьева М.С. Активность цитокинов при иммунизации вакциной против клещевого энцефалита в эксперименте. *Вопросы вирусологии*. 2003; 48(2): 22-5.
19. Бахвалова В.Н., Чичерина Г.С., Панов В.В., Глупов В.В., Морозова О.В. Распределение генетических типов вируса клещевого энцефалита среди спонтанно инфицированных иксодовых клещей и мелких млекопитающих на территории Новосибирской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(4): 26-34.
20. Бахвалова В.Н. *Эпизоотическое состояние природного очага клещевого энцефалита и особенности вирусной популяции в лесостепном Приобье (Западная Сибирь)*. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Кольцово; 1995.
21. Чунихин С.П. Экспериментальные исследования по экологии вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1990; 35(3): 183-8.
22. Мак В.В., Панов В.В., Добротворский А.К., Мошкин М.П. Соприженная изменчивость иммунореактивности и агрессивности у самцов красной полевки (*Clethrionomys rutilus*) и полевой мыши (*Apodemus agrarius*). *Зоологический журнал*. 2002; 81(10): 1260-4.
23. Москвитина Н.С., Кравченко Л.Б., Мак В.В., Добротворский А.К., Панов В.В., Андреевских А.В. и др. Иммунореактивность разных демографических групп в городских популяциях полевой мыши *Apodemus agrarius* (Rodentia, Muridae). *Зоологический журнал*. 2004; 83(4): 480-6.
24. Балашов Ю.С. Роль слюнных желез иксодовых клещей (Ixodidae) в регуляции процесса питания. *Паразитология*. 1994; 28(6): 437-44.
- sistematika, ekologiya, meditsinskoe znachenie*]. Leningrad: Nauka; 1985: 97-187. (in Russian)
8. Panov V.V. Small mammals of forest-park zone of Novosibirsk Scientific center – hosts of immature taiga. In: Vlasov V.V., Repin V.E., eds. *Tick-Borne Infections in Siberian Region [Infektsii, peredavayemye kleshchami v sibirskom regione]*. Novosibirsk: Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 2011: 35-50. (in Russian)
9. Bakhvalova V.N., Dobrotvorsky 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 South-Eastern part of Western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2006; 6(1): 32-41.
10. Bakhvalova V.N., Chicherina G.S., Panov V.V., Glupov V.V., Morozova O.V. Biodiversity of tick-borne encephalitis virus in ixodid ticks and small mammals in Novosibirsk region. *Infektsionnyye bolezni*. 2015; 13(4): 15-21. (in Russian)
11. Morozova O.V., Grishechkin A.E., Bakhvalova V.N., Isaeva E.I., Podchernyaeva R.Ya. Dynamics of reproduction of tick-borne encephalitis virus in tissue cultures. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(2): 40-3. (in Russian)
12. Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Chicherina G.S., Potapova O.F., Isaeva E.I. Comparison of cytokine gene expression in mice immunized or infected with tick-borne encephalitis virus. In: Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N., eds. *Interferon – 2011. Digest of scientific articles for 80th anniversary of Academician of the Russian Academy of Medical Sciences F.I. Ershov [Interferon – 2011. Sbornik nauchnykh statey k 80-letiyu akademika RAMN F.I. Ershova]*. Moscow; 2012: 461-5. (in Russian)
13. Clarke D.H., Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1958; 7(5): 561-73.
14. Deryabin P.G., Lebedeva G.A., Loginova N.V. Neutralization reaction of togaviruses in mice and tissue cultures. In: Gaydamovich S.Ya., ed. *Arboviruses (methods of laboratory and field research)*. Moscow: Nauka; 1986: 120-6. (in Russian)
15. Lakin G.F. *Biometria [Biometriya]*. Moscow: Vysshaya shkola; 1980. (in Russian)
16. Sartakova M.L., Konenkov V.I. Structural bases of intercellular interactions in the process of presentation of antigens to T-lymphocytes: molecules of major histocompatibility complex as one from constituting parts of trimolecular complex. *Uspokhi sovremennoy biologii*. 1997; 117(5): 568-83. (in Russian)
17. Ignat'ev G.M., Otrashvskaya E.V., Vorob'eva M.S. Activity of cytokines during immunization with the vaccine against tick-borne encephalitis in experiment. *Voprosy virusologii*. 2003; 48(2): 22-5. (in Russian)
18. Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephenson J.R., Fooks A.R., Solomon T. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(Pt. 8): 1781-94.
19. Bakhvalova V.N., Chicherina G.S., Panov V.V., Glupov V.V., Morozova O.V. Distribution of tick-borne encephalitis virus genetic subtypes among spontaneously infected ixodid ticks and small mammals in Novosibirsk region. *Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni*. 2015; 20(4): 26-34. (in Russian)
20. Bakhvalova V.N. *Epizootic status of natural focus of tick-borne encephalitis and features of the viral population in forest-steppe Ob region (Western Siberia)*: Diss. Kol'tsovo; 1995. (in Russian)
21. Chunikhin S.P. Experimental studies of tick-borne encephalitis virus ecology. *Voprosy virusologii*. 1990; 35(3): 183-8. (in Russian)
22. Mak V.V., Panov V.V., Dobrotvorskiy A.K., Moshkin M.P. Correlated variability of immunoreactivity and aggression of red vole (*Clethrionomys rutilus*) males and field mice (*Apodemus agrarius*). *Zoologicheskij zhurnal*. 2002; 81(10): 1260-4. (in Russian)
23. Moskvitina N.S., Kravchenko L.B., Mak V.V., Dobrotvorskiy A.K., Panov V.V., Andreevskikh A.V., et al. Immunoreactivity of different demographic groups in urban populations of field mice, *Apodemus agrarius* (Rodentia, Muridae). *Zoologicheskij zhurnal*. 2004; 83(4): 480-6. (in Russian)
24. Balashov Yu.S. The role of salivary glands of ixodid ticks (Ixodidae) in the regulation of feeding process. *Parazitologiya*. 1994; 28(6): 437-44. (in Russian)

REFERENCES

1. Brian T.D. *Viruses and the Cellular Immune Response*. New York: Marcel Dekker; 1993.
2. Donoso Mantke O., Karan L.S., Růžek D. Tick-borne encephalitis viruses: a general overview. In: Růžek D., ed. *Flavivirus Encephalitis*. Rijeka: InTech; 2011: 133-56.
3. Korenberg E.I., Pomelova V.G., Osin N.S. *Natural-focus Tick-borne Infections [Prirodnoochagovye infektsii, peredayushchiesya iksodovymi kleshchami]*. Moscow: Nauka; 2013. (in Russian)
4. Vereta L.A. *Immunology of tick-borne encephalitis based on data of experimental and clinic-epidemiological research in natural foci of Amur region*: Diss. Moscow: 1969. (in Russian)
5. Pogodina V.V., Frolova M.P., Erman B.A. *Chronic Tick-borne Encephalitis [Khronicheskij kleshchevoy entsefalit]*. Novosibirsk: Nauka; 1986 (in Russian)
6. Bakhvalova V.N., Panov V.V., Potapova O.F., Matveeva V.A., Matveev L.E., Morozova O.V. Persistence of tick-borne encephalitis virus in organisms of wild small mammals and in permissive tissue cultures. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii*. 2007; (11): 79-86. (in Russian)
7. Filippova N.A. Systematics and evolution. In: Filippova N.A., ed. *Taiga Tick Ixodes Persulcatus Schulze (Acarina, Ixodidae): Morphology, Systematics, Ecology, Medical Importance [Taezhnyy kleshch Ixodes persulcatus Schulze (Acarina, Ixodidae): morfologiya,*