

УДК 576.895.52 : 576.858.25

**МОНО- И СМЕШАННАЯ ИНФЕКЦИИ
ВИРУСАМИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
И ПОВАСАН ЭКСПЛАНТАТОВ ТКАНЕЙ
КЛЕЩЕЙ РОДА HYALOMMA**

С. П. Чунихин Г. А. Хозинская, Л. Ф. Стефуткина, М. Б. Королев

Приведены результаты вирусологического и электронно-микроскопического изучения репродукции вирусов клещевого энцефалита (КЭ) и Повассан при моно- и смешанной инфекции этими вирусами эксплантатов имагинальных тканей клещей *Hyalomma anatolicum* и *H. dromedarii*. Репродукция вируса в эксплантатах прослежена до 208—217 суток после заражения. Показана возможность совместной репродукции двух модельных вирусов в течение 1—2 мес после одновременного или последовательного заражения эксплантатов. На более поздних сроках эксперимента отмечено полное или частичное подавление размножения одного из вирусов. Это подавление может иметь циклический характер.

Публикации о применении эксплантатов тканей иксодовых клещей для моделирования инфекции переносимых клещами вирусов единичны (Yunker, Coqu, 1967; Чунихин и др., 1981б). Между тем многие особенности репродукции и морфогенеза этих вирусов определяются особенностями эмбриогенеза, физиологии и морфологии переносчика и могут быть изучены с использованием эксплантатов. Поскольку в эксплантатах сохраняется гистоспецифическая характеристика тканей клеща, становится возможным изучение дифференциальной чувствительности разных клеток, тканей и органов переносчика при вирусной репродукции.

В связи с существованием сочетанных очагов различных арбовирусов, имеющих как общие ареалы, так и общих переносчиков, возникает вопрос о возможности одновременного инфицирования переносчиков несколькими вирусами.

Выбор пары модельных вирусов клещевого энцефалита (КЭ) и Повассан — для изучения их смешанной инфекции в эксплантатах тканей иксодовых клещей обусловлен существованием сочетанных очагов этих арбовирусов на Дальнем Востоке СССР (Леонова и др., 1974; Леонова, 1976) и случаями выделения фенотипической смеси обоих вирусов из одного источника (Леонова, Исачкова, 1981).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клещи. Были использованы клещи *Hyalomma anatolicum* из колонии лаборатории экологии арбовирусов ИПВЭ АМН СССР и *H. dromedarii* из колонии Института вирусологии Словацкой Академии наук (ЧССР, Братислава).

Культура эксплантатов имагинальных тканей клещей была приготовлена по методу Юнкер и Кори (Yunker, Coqu 1967). Для этого использовали нимф клещей на заключительной стадии подготовки линьки в имаго (через 20 дней после окончания питания при содержании нимф при температуре 20—24° или через 7 дней — при содержании их в термостате с температурой +37°). Нимф дезинфицировали в течение 10 мин в 70-градусном спирте и многократно обмывали в стерильном физиологическом растворе. Затем клещей впаивали вентральной стороной в воск, покрывали каплей стерильной среды и препарировали. Извлеченные из нимфальной кутикулы ткани имаго переносили

на покровные стекла, помещали в пенициллиновые флаконы и оставляли на 1 ч для прикрепления эксплантатов, спустя час во флаконы заливали по 1 мл среды и помещали их в термостат с температурой $+27^{\circ}$.

С р е д а. Была использована среда, содержащая 0.5% гидролизата лактальбумина на растворе Хенкса, в которую добавляли 20% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, инактивированной в течение 1 ч при $+56^{\circ}$, а также пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Полную смену среды проводили только при заражении эксплантатов, в дальнейшем свежую среду добавляли в культуру при взятии проб на наличие вируса.

В и р у с ы. Эксперименты были проведены со штаммом Б-493 вируса КЭ, выделенным в 1977 г. от клещей *Ixodes persulcatus*, и штаммом П-40 вируса Повассан, изолированным в 1974 г. от клещей *Haemaphysalis longicornis*. Оба штамма были выделены на территории Приморского края, в лаборатории прошли 5—9 пассажей через мозг новорожденных белых мышей (НБМ). Заражение эксплантатов проводили на 2-е или 8-е сутки культивирования путем замены среды на свежую, содержащую вирус в нужной концентрации. Для изучения смешанной инфекции группы эксплантатов заражали двумя вирусами одновременно или поочередно с интервалом 24 дня. Контролем служили группы эксплантатов, инфицированные одним из вирусов, а также среда, содержащая соответствующие дозы вирусов и инкубированная в аналогичных условиях.

Т и т р о в а н и е вирусов проводили на НБМ, заражая их в мозг 0.03 мл последовательных 10-кратных разведений исследуемого вирусосодержащего материала. Пробы культуральной жидкости исследовали на содержание вируса с интервалом 2—4 или 7—14 дней. Титр вируса определяли по методу Кербера в модификации Ашмарина.

И д е н т и ф и к а ц и ю вирусов проводили с помощью реакции нейтрализации (РН) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА). В предварительных опытах было установлено, что для четкой дифференциации использованных нами штаммов достаточно чувствительности названных методов. Было также показано, что при пассировании смеси вирусов КЭ и Повассан через мозг мышей не происходит ингибиции какого-либо из них на протяжении 2—3 пассажей.

В РТГА исследовали сахарозо-ацетоновые антигены, приготовленные из мозга НБМ, зараженных пробами среды с культуры тканей клещей. Иммуные кроличьи сыворотки для РТГА обрабатывали ацетоном или каолином и гусиными эритроцитами.

РН ставили на мышах. Для идентификации вирусов в мозге НБМ, зараженных пробами культуральной жидкости, использовали мышей весом 6—7 г. Для определения вирусов непосредственно в культуральной среде РН представляли на НБМ. При любой модификации РН титровали исследуемый вирусосодержащий материал, смешивая его последовательные 10-кратные разведения с равными объемами нормальной или иммунной сыворотки крови кролика, разведенной 1 : 4. Смеси предварительно инкубировали при 37°C в течение 60 мин, затем вводили мышам в мозг по 0.03 мл. Результаты оценивали по величине индекса нейтрализации. Специфическим считали снижение титра вируса в присутствии иммунной сыворотки на $1.8 \lg LD_{50/0.03\text{мл}}$ или более.

Иммуные сыворотки получали после 3-кратного внутривенного введения кроликам с интервалом 7 дней 1 мл 10% вирусосодержащей мозговой суспензии, приготовленной на фосфатном буферном растворе. Сыворотку брали через 7 дней после последней иммунизации.

Э л е к т р о н н о - м и к р о с к о п и ч е с к и е исследования. Материал изучали на 15-е, 30-е, 60-е и 120-е сутки после заражения эксплантатов. Эксплантаты промывали 0.1 М какодилатным буферным раствором рН 7.2, фиксировали 2%-ным раствором глутаральдегида, приготовленным на том же буфере, с последующей дофиксацией в 1%-ном растворе четырехокси осмия. После обезвоживания в спиртах восходящих концентраций материал заливали в эпон-аралдит (Mollenhauer, 1964). Ультратонкие среды готовили на ультрамикротоме ОМ-3 «Reichert», контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Полученные препараты изучали в электронном микроскопе JEM-100В при ускоряющем напряжении 80 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, вирусы Повассан и КЭ в течение нескольких месяцев персистировали в долгоживущей первичной культуре имагинальных тканей клещей. Размножение вирусов прекращалось, видимо, лишь с гибелью эксплантатов. Накопление вируса в культуральной среде было наибольшим на начальных стадиях инфекции (2—3 недели после заражения), затем титры внеклеточного вируса постепенно снижались. При заражении эксплантатов двумя вирусами с интервалом в 24 дня был отмечен второй пик вирусной репродукции, возникший на 66-е сутки после первичного инфицирования (табл. 1). В контрольных образцах вирусосодержащей среды, использованной для заражений эксплантатов, вирусы КЭ и Повассан сохранялись не больше 10 суток.

При одновременном заражении вирусами Повассан и КЭ эксплантатов клещей *H. anatolicum* на протяжении 80 дней в культуральной жидкости обнаруживались оба вируса (табл. 2). В течение первых 50 суток вирусная популяция

Таблица 1
Характеристика экспериментальной флавивирусной инфекции
эксплантатов имагинальных тканей клещей

Вид клещей	Первичное заражение		Вторичное заражение		Максимальное накопление вируса		Последнее выделение вируса	
	вирус	доза (lg LD ₅₀ /мл)	вирус	доза (lg LD ₅₀ /мл)	сутки после заражения	титр (lg LD ₅₀ /мл)	сутки после заражения	титр (lg LD ₅₀ /мл)
<i>Hyalomma anatolicum</i>	Повассан	3.5	Не производили	»	18—22 ¹	4.0	110	1.8
	КЭ	4.0			22	5.0	145	3.5
	Повассан+КЭ	3.5+4.0			16	5.0	208*	1.8
<i>Hyalomma dromedarii</i>	Повассан	2.5	КЭ ²	2.8	21—24	4.5	100	2.0
	КЭ	2.0			24	4.5	100	1.8
	Повассан+КЭ	2.5+2.0			7—21	4.0	66	3.0
	Повассан	2.5			66 ⁴	5.0	112	2.2
	КЭ	2.0			42	5.0	88	2.0
					66	5.0	217*	2.0
					42	5.0	193	2.0

Примечание. В числителе — сутки после первого заражения, в знаменателе — после суперинфицирования; числа со звездочкой — срок наблюдений. ¹ В течение указанного периода титр вируса в культуральной среде оставался на одном уровне. ² К моменту суперинфицирования в культуральной среде эксплантатов с моноинфекцией вирусами КЭ и Повассан титр вируса достиг 4.5 lg LD₅₀/мл.

имела характер искусственной смеси (не нейтрализовалась на одной из иммунных сывороток, а только их смесью). Результаты РН, относящиеся к 80-м суткам после заражения культуры (табл. 2), указывают на возможное фенотипическое смешение вирусов (вирус нейтрализовался каждой иммунной сывороткой). На протяжении второй половины опыта (табл. 2, 93—183-е сутки) в культуральной жидкости был обнаружен только вирус Повассан.

В опыте с эксплантатами имагинальных тканей клещей *H. dromedarii* также было показано одновременное присутствие двух вирусов в культуральной среде на 25-й день после заражения (позднее идентификацию вирусов не проводили).

При последовательном заражении двумя вирусами эксплантатов клещей *H. dromedarii* вне зависимости от порядка заражения в культуральной жидкости удавалось идентифицировать оба вируса, находящиеся в состоянии искусственной смеси, в течение месяца после суперинфицирования (табл. 3). На более поздних сроках эксперимента в культуральной среде эксплантатов, зараженных сначала вирусом КЭ, а затем — вирусом Повассан, обнаруживали присутствие то одного, то другого вируса или же вирусной популяции со сме-

Т а б л и ц а 2

Идентификация вирусов в культуральной жидкости экплантатов
клетей со смешанной инфекцией (одновременное заражение двумя вирусами)

Вид клещей	Вирус	Дни после заражения	Титры антигенов ¹ в РТГА в присутствии сыворотки, содержащей антитела к вирусу		Индекс нейтрализации ² в присутствии сыворотки, содержащей антитела к		
			Повассан	КЭ	вирусу Повассан	вирусу КЭ	двум вирусам
<i>Hyalomma anatolicum</i>	Повассан+КЭ	24	40	20	0.2	0.6	1.8*
		44	40	80	н. и.	н. и.	н. и.
		51	20	80	0.5	0.2	3.0
		80	20	80	1.8	2.8	2.8
		93	40	10	2.2	1.0	3.0
		104	Не исследован		4.8	1.5	4.0
		114	640	40	2.8	-0.2	3.0
		166	160	20	3.0	0.8	2.8
		183	Не исследован		3.8	-0.8	2.5
		86	40	10	3.6	0.2	2.0
<i>Hyalomma dronedarii</i>	Повассан+КЭ	86	40	80	-0.6	3.8	2.3
		25	40	160	1.5	1.0	2.8*
		21	80	10	3.2	0.5	2.3
		21	0	40	0.7	2.8	2.0

Примечание. Здесь и в табл. 3. ¹ Антигены приготовлены из мозга НБМ, зараженных пробами культуральной жидкости; приведены обратные величины титров; ² в РН исследовали мозг НБМ, зараженных пробами культуральной жидкости, или пробы культуральной жидкости (отмечено звездочкой): индекс нейтрализации выражен в Ig LD₅₀/0.03 мл.

Т а б л и ц а 3

Идентификация вирусов в культуральной жидкости экплантатов
клетей со смешанной инфекцией (суперинфицирование на 24-й день после заражения)

Вирус и порядок заражения	День после заражения:		Титры антигенов ¹ в РТГА в присутствии сыворотки, содержащей антитела к вирусу		Индекс нейтрализации ² в присутствии сыворотки, содержащей антитела к			
	первого	второго	Повассан	КЭ	вирусу Повассан	вирусу КЭ	двум вирусам	
КЭ+через 24 дня Повассан	42	18	80	160	1.3	1.3	3.5*	
	53	29	160	80	1.6	1.3	2.4	
	66	42	320	80	1.9	1.2	2.2	
	94	70	160	40	2.8	1.2	2.8	
	104	80	80	160	1.8	2.0	2.5*	
	139	115	320	40	1.0	2.5	3.0	
	147	123	40	160	0.2	3.5	2.8	
	154	130	Не исследованы		1.2	3.2	3.2	
	185	161	20	160	0.5	2.2	1.2	
	195	171	20	40	3.8	0.2	3.0	
	217	193	Не исследованы		3.5	1.5	3.2	
	Повассан+через 24 дня КЭ	42	18	160	20	1.0	1.0	2.0*
		53	29	40	160	1.1	1.1	1.8
94		70	320	20	2.1	0	3.4	
Повассан КЭ	24	—	80	10	3.0	0.4	2.2	
	24	—	10	40	0.6	3.2	2.0	

Примечание. Тире — суперинфицирование не производили.

шанным антигенным фенотипом. Поэтому в данном случае можно утверждать, что совместная персистенция двух вирусов продолжалась по меньшей мере 161 сутки (последнее обнаружение вируса КЭ), а может быть, и до окончания эксперимента (табл. 3, 193-и сутки). Показанная цикличность в репродукции вирусов при длительной персистенции в экплантатах клещей, вероятно, связана с их взаимодействием, так как при моноинфекции она не была отмечена (рис. 1).

Обнаружение только вируса Повассан в течение трех последних месяцев эксперимента при одновременном заражении экплантатов клещей *H. anatolicum*

исим двумя модельными вирусами могло произойти в результате элиминации вируса КЭ (табл. 2).

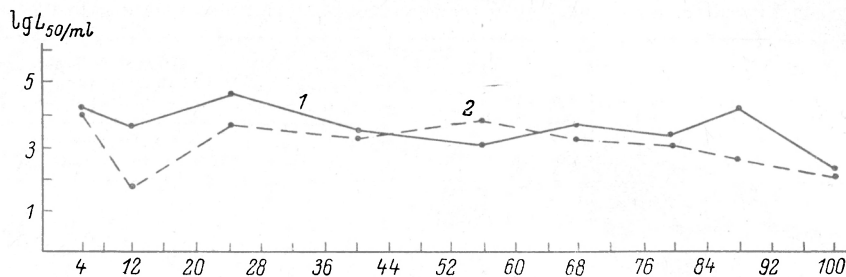


Рис. 1. Репродукция вирусов КЭ в Повассан в эксплантатах клещей *H. dromedarii* при моноинфекции.

1 — вирус Павассан, 2 — вирус КЭ, по оси абсцисс — сутки после заражения.

При электронно-микроскопическом изучении эксплантатов после заражения их вирусом КЭ или Повассан морфологически зрелые вирусные частицы на ранних этапах персистентной инфекции обнаруживались преимущественно внутриклеточно, в расширенных цистернах гранулярного эндоплазматического

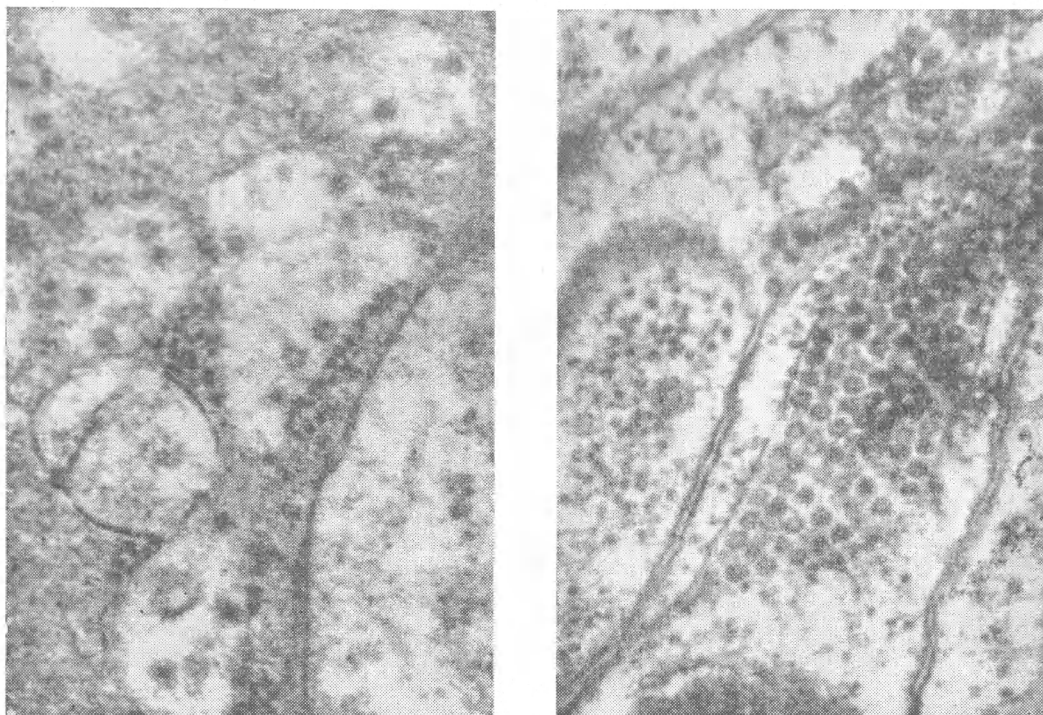


Рис. 2. Частицы вируса КЭ в расширенных полостях шероховатого эндоплазматического ретикулума, 15-е сутки после заражения. Увел. 80 000 \times .

Рис. 3. Частицы вируса КЭ в межклеточном пространстве и кристаллоподобное скопление вируса в просвете шероховатого эндоплазматического ретикулума, 60-е сутки после заражения. Увел. 60 000 \times .

ретикулума. В очень редких случаях удавалось обнаружить вирионы, расположенные в межклеточном пространстве (рис. 2). Следует отметить маловыраженную дифференциацию этих клеток эксплантатов, слабое развитие в них гранулярного эндоплазматического ретикулума, наличие большого числа свободных рибосом и незначительного количества овальных митохондрий.

На поздних этапах инфекции (60—120-е сутки) подавляющее число вирионов обнаруживалось во внеклеточном пространстве. Наблюдались также значительные кристаллоподобные скопления вирионов в полостях ретикулума и отдель-

ные вирусные частицы, секвестированные в лизосомоподобных образованиях. Одной из самых характерных особенностей персистенции обоих модельных флавириусов в эксплантатах клещей оказалось образование значительного количества неполных форм, т. е. частиц, лишенных электронноплотного нуклеоида. С удлинением сроков инфекции эксплантатов доля неполных форм увеличивалась, достигая 50—60% от их общего количества (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных экспериментальных данных позволяет заключить что использование эксплантатов иксодовых клещей открывает принципиально новые возможности для изучения репродукции и морфогенеза арбовирусов в системе *in vitro*.

Выявлены следующие преимущества эксплантатов перед первичными культурами клеток клещей: 1. Простота культивирования. 2. Возможность очень длительного наблюдения (свыше 7 мес) за одним и тем же образцом. 3. Сохранение гистоспецифической характеристики клеток.

Использование эксплантатов клещей впервые позволило выяснить характер взаимоотношений двух антигенно родственных флавириусов — КЭ и Повассан — в тканях переносчика. Показано отсутствие гетерологичной интерференции между этими вирусами на ранних стадиях персистентной инфекции (1—2 мес после заражения) и подавление репродукции одного из вирусов на ее поздних этапах. Результаты самого длительного опыта с последовательным заражением эксплантатов *H. dromedarii* вирусом КЭ, а затем — Повассан, позволяют считать, что это подавление может быть временным и отражать цикличность в репродукции вирусов, обусловленную их взаимодействием.

Видимо, экстраполяция данных о характере взаимодействия вирусов КЭ и Повассан в эксплантатах клещей возможна, с определенными ограничениями, на систему *in vivo*, т. е. на самих клещей. Так, было показано, что клещи *I. persulcatus*, зараженные вирусами КЭ и Повассан, при кровососании передавали или оба вируса, или один из них (Чунихин и др., 1981а). По нашему мнению, эти особенности трансмиссивной передачи модельных вирусов иксодовыми клещами отражают изменения в характере взаимодействия данных вирусов, аналогичные выявленным в системе *in vitro* на разных сроках смешанной персистентной инфекции.

Литература

- Леонова Г. Н. Вирусы, выделенные из клещей в Приморском крае. — Автореф. канд. дис. М., 1976. 48 с.
- Леонова Г. Н., Шестаков В. И., Сафронов А. В., Беликова Н. П. Экологии вируса Повассан в Приморском крае. — В кн.: Экология вирусов, связанных с птицами. Минск, 1974, с. 81—82.
- Леонова Г. Н., Исачкова Л. М. Менингоэнцефалит, вызванный вирусом Повассан в Приморском крае. — В кн.: Арбовирусы. М., 1981, стр. 107—111.
- Чунихин С. П., Кочетова Г. А., Стефуткина Л. Ф., Королев М. Б. Смешанная инфекция вирусами клещевого энцефалита и Повассан иксодовых клещей и их эксплантатов. — В кн.: Матер. 19-й сессии ИПВЭ АМН СССР. М., 1981а, с. 94—95.
- Чунихин С. П., Кочетова Г. А., Стефуткина Л. Ф., Королев М. Б. Характеристика репродукции вирусов клещевого энцефалита и Повассан в эксплантатах имаго *Dermacentor silvarum*, извлеченных из нимфальной кутикулы. — Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 1981б, № 4, стр. 61—64.
- Mollenhauer H. H. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. — Stain Technol., 1964, vol. 39, p. 111—114.
- Yunker C. E., Cory J. Growth of Colorado tick fever (CTF) virus in primary tissue cultures of its vector *Dermacentor andersoni* Stiles (Acarina: Ixodidae), with notes on tick tissue culture. — Exptl. Parasit., 1967, vol. 20, p. 267—277.

Институт полиомиелита
и вирусных энцефалитов
АМН СССР, Москва

Поступило 25 VI 1983

MONO- AND MIXED INFECTION OF EXPLANTS OF TISSUES
OF THE TICKS OF THE GENUS HYALOMMA WITH VIRUSES
OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS AND POVASSAN

S. P. Chunikhin, G. A. Khozinskaya, L. E. Stefutkina, M. E. Korolev]

S U M M A R Y

The paper presents results of virusological and electron microscope studies of the reproduction of viruses of tick-borne encephalitis and Povassan at mono- and mixed persistent infection of explants of imaginal tissues of *Hyalomma anatolicum* and *H. dromedarii* with these viruses. The virus reproduction in explants was observed within 208 to 217 days after the infection. Joint reproduction of two model viruses within 1—2 months after the infection can take place and after that the inhibition of the reproduction of one of the viruses. This inhibition can be of cyclic character.
