

УДК 576.895.421 : 576.858

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ЗАРАЖЕНИЕ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ
ВИРУСОМ КАРШИ

В. А. Аристова, Е. А. Гущина, В. Л. Громашевский, Б. В. Гуцин

Особенностью арбовирусов является размножение в организме беспозвоночных животных, в частности кровососущих членистоногих, которые могут служить переносчиками вируса в естественных условиях. В настоящей работе мы приводим результаты вирусологических исследований иксодовых клещей, зараженных вирусом Карши (*Flavivirus* сем. *Flaviviridae*).

Имеющиеся в литературе сведения о репродукции вируса в клещах посвящены главным образом вирусу клещевого энцефалита. При этом инфицирование клещей проводили чаще всего путем парентерального введения вирусосодержащей суспензии, т. е. минуя кишечный барьер переносчика. При таком методе экспериментального заражения из инфекционного процесса на уровне организма клеща исключается естественный путь заражения через кишечник, клетки которого при этом, по-видимому, первыми подвергаются заражению. В настоящей работе мы приводим результаты вирусологических исследований иксодовых клещей, зараженных вирусом Карши (*Flavivirus* сем. *Togaviridae*) методом принудительного кормления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использованы два штамма вируса Карши: штамм Каз-816, изолированный в Казахстане от клещей *Hyalomma asiaticum* и штамм Уз-2247, изолированный от клещей *Ornithodoros papillipes* (Lvov e. a., 1976). Оба штамма прошли 10 пассажей через мозг 7-граммовых белых мышей. Лабораторные культуры клещей *H. asiaticum* и *H. anatolicum*, а также *Dermacentor niveus*, использованные в эксперименте, содержали во влажных камерах при температуре +4 °С. За две недели до начала опыта они были перенесены в лабораторное помещение, где содержались при естественном освещении и температуре 20—22 °С. Инфицирование клещей проводили на приборе дозированного кормления (Алексеев, 1974). Каждый клещ получал в среднем от 0.1 до 0.5 мкл 20%-ной вирусосодержащей суспензии, смешанной в равных количествах с дефибринированной кровью белой мыши при титре вируса в суспензии от 4.5 до 9.0 lg ЛД₅₀/0.02 мл. В последних опытах инфицирующая жидкость была несколько модифицирована: вместо дефибринированной крови белой мыши в том же соотношении с вирусосодержащей суспензией (1 : 1) добавляли 30%-ный раствор бараньих эритроцитов. Всего было заражено 510 особей иксодовых клещей, причем в опыт брали как самок, так и самцов. После инфицирования клещей делили на две группы. Одну группу составляли особи, которых более не докармливали; другую — клещи, которых докармливали на чистых белых мышках или на приборе принудительного кормления. Зараженных клещей содержали во влажных камерах при +20—22 °С и при +37 °С. Наличие вируса в клещах определяли методом биологического титрования. Титрование вируса проводили на 2-недельных белых мышках, путем введения в мозг каждой

мыши по 0.03 мл вирусосодержащей суспензии, и на мышках-сосунках — по 0.02 мл вирусосодержащего материала. Для исчисления ЛД₅₀ использовали метод статистического учета Рида и Менча. Были также использованы метод Кунса, непрямой метод — НМФА (Гайдамович и др., 1974) и метод электронной микроскопии. Для электронно-микроскопических исследований зараженных клещей вскрывали в фосфатном буфере. Отпрепарированные органы клещей фиксировали в 2.5%-ном глютаральдегиде на фосфатном буфере и в 1.0%-ном осмии. Обезоживание проводили через серию спиртов в возрастающей концентрации и заливали в аралдит. Срезы получали на ультратоме ЛКВ, контрастировали урацил-ацетатом и цитратом свинца. Окрашенные срезы исследовали в электронном микроскопе JEM-100В. Вскрытие и титрование суспензии органов зараженных клещей, инкубированных при +22 °С проводили через 24, 48, 72, 96 ч и далее на 5-е, 6-е, 7-е, 15-е, 21-е, 29-е, 30-е, 36-е, 43-е, 45-е, 46-е, 50-е, 56-е сутки; 60 сут — срок наблюдения. Вскрытие клещей, инкубированных при +37 °С., проводили через 2, 4, 24, 48, 72, 96 ч после заражения без дополнительной подкормки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены результаты исследования клещей методом биологического титрования и НМФА, инфицирующий агент — штамм Каз-816. Из табл. 1 видно, что при исходном титре 6.0 lg ЛД₅₀/0.3 мл в докормленных клещах *H. asiaticum* на 20-е сутки после инфицирования титр вируса был 2.0 lg. В эти же сроки наблюдалось специфическое свечение вирусного антигена в мальпигиевых сосудах, гемолимфе и яичниках. Кишечник клещей методом НМФА не был исследован. На 30-е, 45-е и 60-е сутки отмечено нарастание титра вируса

Т а б л и ц а 1

Результаты исследования клещей, экспериментально зараженных вирусом Карши — штамм Каз-816, методом биологического титрования и НМФА

Титр вируса при заражении	Клещи (24 особей)	Результаты титрования в lg ЛД ₅₀ /0.03 мл в разные сроки после инфицирования на сутки:					Свечение вирусного антигена на сутки	
		10-е	20-е	30-е	45-е	60-е	в слюнных железах	в других органах
6.0	<i>H. asiaticum</i> (+)	0	2.0	3.5	4.0	4.0	30	20
6.0	<i>D. niveus</i> (+)	0	2.5	2.5	3.0	—	45	Нет
6.0	<i>H. asiaticum</i> (—)	0	1.0	1.0	2.0	3.5	60	Нет
6.0	<i>D. niveus</i> (—)	0	1.0	2.0	2.5	—	60	Нет
4.5	<i>H. asiaticum</i> (+)	0	0	0	4.5	—	45	45
4.5	<i>D. niveus</i> (+)	0	0	0	4.5	—	45	45
4.5	<i>H. asiaticum</i> (—)	0	0	0	1.0	3.0	60	45
4.5	<i>D. niveus</i> (—)	0	0	0	1.5	2.0	60	45

Примечание. Плюс — клещи подкормлены, минус — клещи не подкормлены.

до 4.5 lg и появление специфического свечения в слюнных железах. В докормленных клещах *D. niveus* при том же исходном титре вирус также был обнаружен на 20-е сутки, титр вируса — 2.5 lg. Однако методом НМФА выявить вирусный антиген в различных органах клещей не удалось. Специфическое свечение в слюнных железах было отмечено на 45-е сутки, титр вируса — 3.0 lg (табл. 1).

У неподкормленных клещей *H. asiaticum* и *D. niveus* вирус был обнаружен только на 45-е сутки после заражения, титр вируса — 2.0 lg. Свечение вирусного антигена было обнаружено в слюнных железах на 60-е сутки после инфицирования. При исходном титре вирусосодержащей суспензии 4.5 lg в докормленных клещах *H. asiaticum* и *D. niveus* вирус также был обнаружен только на 45-е сутки, но титр вируса в зараженных клещах при этом достигал исходного. Свечение вирусного антигена наблюдалось в мальпигиевых сосудах, ге-

молимфе и слюнных железах также на 45-е сутки. У неподкормленных клещей при исходном титре 4.5 lg титр вируса на 45-е сутки составлял 1.5 lg. Однако в эти же сроки можно было наблюдать свечение вирусного антигена в мальпигиевых сосудах, гемолимфе и яичниках и только на 60-е сутки — в слюнных железах.

Т а б л и ц а 2

Результаты исследования клещей, экспериментально зараженных вирусом Карши — штамм Уз-2247, методом биологического титрования. Клещи содержались при +20—22 °С

Титр вируса при заражении	Клещи (27 особей)	Результаты титрования в lg ЛД ₅₀ /0.03 мл на мышах (7 г) в разные сроки после инфицирования на сутки:				На мышах-сосунках на 28-е сутки
		7-е	14-е	21-е	28-е	
5	<i>H. asiaticum</i>	1.0	1.0	1.5	0	—
6	Те же	0	0	0	1.5	—
7	» »	0	0	1.0	1.5	—
8	» »	0	0	1.5	1.5	—
9	» »	1.5	2.0	3.2	1.7	—
5	<i>H. anatolicum</i>	1.5	2.3	1.0	0	0
6	Те же	1.0	1.0	1.3	1.25	1.75
7	» »	1.5	1.8	1.5	0.2	4.5
8	» »	1.8	1.8	1.0	1.0	4.5
9	» »	1.0	2.0	2.5	1.7	4.5

В табл. 2 представлены результаты биологического титрования на 7-граммовых белых мышах и мышах сосунках пулов зараженных клещей; инфицирующий агент — штамм Уз-2247.

Из табл. 2 видно, что наибольшее содержание вируса в клещах наблюдается на 14-е и 21-е сутки внешней инкубации при исходном титре заражения 8—9 lg. Одновременно с титрованием проводили вскрытие клещей с целью исследования методом электронной микроскопии отдельных органов членистоногих. Через 24—48 ч после заражения были обнаружены лишь отдельные вирусные частицы в просвете кишечника среди гемоглобиновых включений. На 5-е сутки единичные вирусные частицы наблюдались в цитоплазматических вакуолях клеток стенки кишечника. На 7—8-е сутки вирусные частицы были обнаружены как в цитоплазматических вакуолях, так и в межклеточных пространствах. В просвете кишечника вирусные частицы обнаружены не были. На 14-е сутки после заражения большое скопление вирусных частиц было обнаружено в просвете складки кишечника, а также отдельные группы вирусных частиц в межклеточном пространстве. На более поздних сроках (43—56 сут) после заражения были обнаружены скопления вирусных частиц в межклеточном пространстве и в зоне базальной мембраны (более подробно см. Гущина, Аристова и др., 1984). Через 46 сут после заражения группа вирусных частиц была обнаружена в вакуолях цитоплазмы клеток слюнных желез клещей *H. asiaticum* (рис. 1). При электронно-микроскопическом исследовании клещей, инкубированных при 37 °С, были получены следующие результаты: через 2 и 4 ч после заражения были обнаружены скопления вирусных частиц лишь в просвете кишечника (рис. 2, А). Через 24 и 48 ч после заражения в цитоплазме клеток кишечника обнаружены многочисленные вакуоли, содержащие как отдельные вирусные частицы, так и группы частиц (рис. 2, Б). На 3-и сутки после заражения были обнаружены лишь отдельные вирусные частицы как в цитоплазме клеток кишечника, так и в межклеточных пространствах (рис. 2, В), а на 4-е сутки вирусные частицы вообще не были обнаружены. Из тех особей клещей, которые были вскрыты для исследования в электронном микроскопе, готовили суспензию и титровали на мышах-сосунках. Титрование проводили через сутки после заражения и далее до 4-х суток. Титр вируса в клещах на протяжении всего периода наблюдений был высоким — 7.5 lg. Такой титр вируса был отмечен уже на 1-е сутки и сохранялся в течение последующих четырех. Видимо, уже к 24-му ч после заражения наступает предельное накопление вируса в клещах при температуре +37 °С, что совпадает с результатами эксперименталь-

ного заражения клещей вирусом клещевого энцефалита (Чунихин, Куренков, 1980).

В заключение всего изложенного представляется возможным подчеркнуть следующие моменты: 1. Вирус Карши обладает большой экологической пластичностью. В природе он был выделен от клещей, относящихся к разным систематическим группам — *H. asiaticum* и *O. papillipes*. В эксперименте клещей удавалось заразить как штаммом, изолированным от иксодовых клещей, так и другим штаммом, изолированным от аргасовых клещей. Вирусом Карши в эксперименте удавалось также заразить и клещей *Argas persicus* и некоторые виды комаров (Khutoretskaja, Aristova, 1985). 2. В организме клещей идет размножение вируса, о чем свидетельствует постепенное нарастание титра вируса в зараженных клещах. На основании результатов электронной микроскопии можно заключить, что в естественных условиях вирус вместе с кровью хозяина-прокормителя во время кровососания попадает в кишечник клеща. Вначале вирусные частицы удается наблюдать только в просвете кишечника, где и происходит его первичное размножение и накопление. Скорость репродукции вируса зависит от температуры, оптимальная температура +37 °С. На 46-е сутки после заражения вирусные частицы были обнаружены в вакуолях клеток слюнных желез клещей. Свечение вирусного антигена в гемолимфе, мальпигиевых сосудах, половых органах и слюнных железах наблюдается спустя 1.5—2 мес после заражения.

Л и т е р а т у р а

- А л е к с е е в А. Н. Искусственное дозированное кормление клещей — основных переносчиков клещевого энцефалита. — Паразитология, 1971, т. 71, вып. 5, с. 392—400.
- Г а й д а м о в и ч С. Я., С в е ш н и к о в а Н. А., П о л я к о в а А. Н., Ш а х а н и н а К. Л. Иммуные асцитические жидкости мышей как источник специфических глобулинов для реакции иммунофлюоресцентного окрашивания с арбовирусами. — Бюл. ВОЗ, 1974, т. 49, № 5, с. 501—503.
- Г у щ и н а Е. А., А р и с т о в а В. А., Г р о м а ш е в с к и й В. Л., В о л ц и т О. В., Г у щ и н Б. В., К л и м е н к о С. М. Электронно-микроскопическое исследование средней кишки клещей после экспериментального заражения вирусом Карши. — Вопр. вирусол., 1984, вып. 2, с. 235—240.
- Ч у н и х и н С. П., К у р е н к о в В. В. Изучение динамики репродукции вируса клещевого энцефалита в клещах *Hyalomma plumbeum*. — Мед. паразитол., 1980, т. 49, № 2, с. 25—27.
- L v o v D. K., N e r o n o v V. M., G r o m a s h e v s k y V. L., S k v o r t s o v a T. M., B e r e s i n a L. K., S i d o r o v a G. A., Z h m a e v a Z. M., G o f m a n Y u. P., K l i m e n k o S. M., F o m i n a K. B. «Karchi» virus, a new flavivirus (Togaviridae) isolated from *Ornithodoros papillipes* (Birula 1995) ticks in Uzbek SSR. — Arch. Virol., 1976, Bd 50, S. 29—36.
- K h u t o r e t s k a j a N. V., A r i s t o v a V. A., R o g o v a j a S. G., L v o v D. K., K a r i m o v S. K., S k v o r t s o v a T. M., K o n d r a s h i n a N. G. — Experimental study of the reproduction of Karchi virus (Flaviviridae, Flavivirus) in some species of mosquitoes and ticks. — Acta virol., 1985, p. 29.

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского
АМН СССР, Москва

Поступила 25 II 1985

EXPERIMENTAL INFECTION OF IXODID TICKS WITH KARSHA VIRUS

V. A. Aristova, E. A. Gushchina, V. L. Gromashevsky, V. V. Gushchin

S U M M A R Y

The ixodid ticks *Hyalomma asiaticum*, *H. anatolicum*, *Dermacentor niveus* were infected experimentally with Karsha virus. The virus replication has been proved to occur in the tick's organism. The titre of the virus grows gradually in infected ticks. Entering the tick's gut during its feeding virus particles penetrate into the gut walls where primary multiplication and accumulation of the virus take place.

Вкладыш к ст. В. А. Аристовой и др.

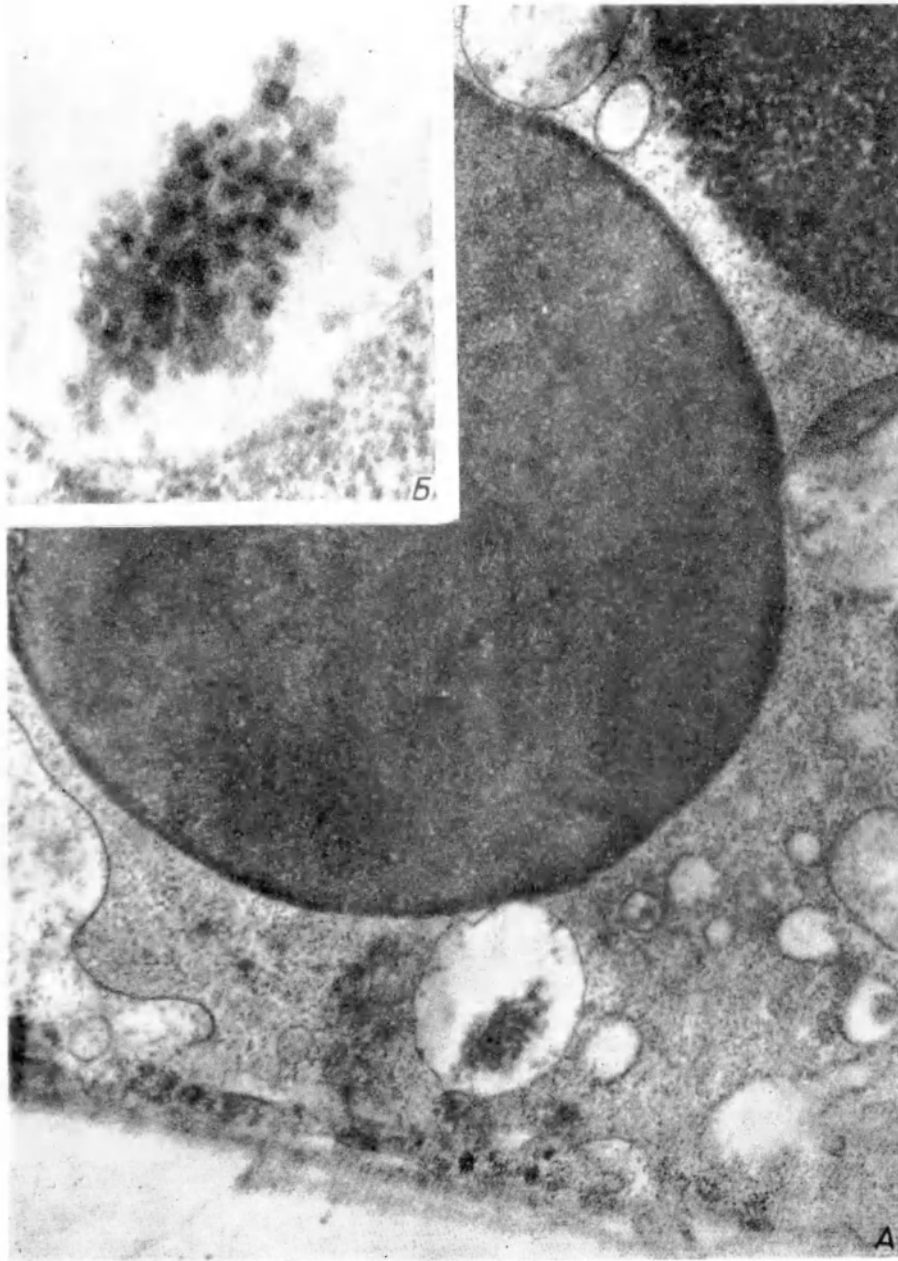


Рис. 1. Участок среза секреторной альвеолы клеща *Hyalomma asiaticum* через 46 сут после заражения вирусом Карши.

А — часть цитоплазмы клетки, содержащей секреторные гранулы. Внизу вакуоль с группой вирусных частиц, $\times 30\ 000$; Б — группа вирусных частиц при большом увеличении, $\times 100\ 000$.

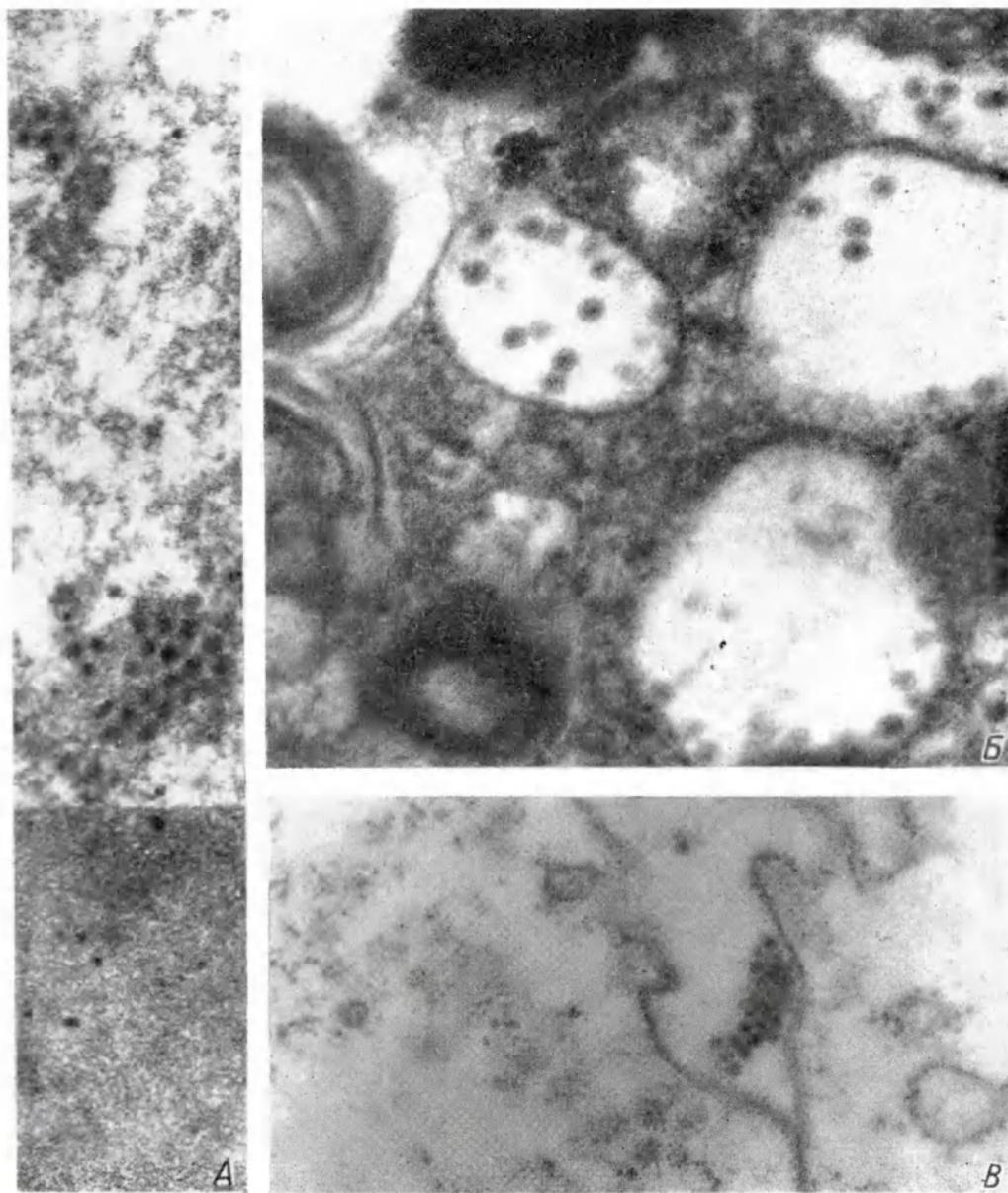


Рис. 2. Участок среза содержимого и клеток кишечника клеща *H. anatolicum* после заражения вирусом Карши.

А — скопление вирусных частиц в содержимом кишечника через 4 ч после заражения, $\times 90\ 000$; Б — вирусные частицы в питрацитоплазматических вакуолях клеток стенки кишечника через 24 ч после заражения, $\times 90\ 000$; В — скопление вирусных частиц в межклеточном пространстве через 72 ч после заражения, $\times 45\ 000$.