# ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ

УДК 616.988.25-022.935.4

А.Н. Алексеев[1], А.Д. Ботвинкин[2], Г.А. Данчинова[3], Е.В. Дубинина[1], М.А. Хаснатинов[3]

## ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ КЛЕЩЕЙ ИКСОДИД – ОСНОВА РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

[1]Зоологический институт РАН (Санкт-Петербург)
[2] Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)
[3] Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)

*Более 7000 клещей Ixodes persulcatus Schulze and Ixodes ricinus (L.) были собраны в различных частях Евразии от Дании до Дальнего Востока (Россия) для того, чтобы сопоставить распределение субтипов ВКЭ (на основе литературных данных) и генотипов иксодовых клещей. Для выявления генотипического разнообразия клещей использовали NAD MDH изоферментное генотипирование с электрофорезом в полиакриламидном геле. Шесть MDH-генотипов (3 монозиготы и 3 гетерозиготы), несущих 3 аллели, выявлено в популяциях иксодид. Клещи с аллелью 1 (самая тяжелая) были отнесены к первым геногруппам. Их распределение на протяжении ареала рода Ixodes позволило выявить тенденцию распределения четвертого генотипа (аллели 1.3) с запада на восток, которая совпадает с повышением распространенности 3-го и 1-го субтипов ВКЭ. Вариации распределения клещей и генотипов ВКЭ даже в одном и том же районе могут быть полезны для прогнозирования циркуляции более или менее опасных штаммов ВКЭ. Также были установлены различия в дневной и ночной активности разных генотипов клещей. Это может означать, что представители разных генотипов могут питаться на животных с разными ритмами суточной активности.*

**Ключевые слова:** *генотипы клещей Ixodes, вирус клещевого энцефалита, субтипы*

## IXODES TICK POPULATION HETEROGENEITY AS A BASIS OF EXISTING OF SIBERIAN AND FAR EAST TBEV GENOTYPES DIVERSITY

A.N. Alekseev, A.D. Botvinkin, G.A. Danchinova, E.V. Dubinina, M.A. Khasnatinov

[1]Zoological Institute of RAS,Sankt-Petersburg
[2] Irkutsk State Medical University, Irkutsk
[3] Institute of Epidemiology and Microbiology SC ME ESSC SB RAMS,Irkutsk

*Over 7 000 Ixodes persulcatus Schulze and Ixodes ricinus (L.) adults were collected by flagging in different parts of Eurasia, ranging from Denmark in the west to the Far East of Russia in the east to compare the distribution of subtype of TBEV viruses (mainly according to the referenced data) with the genotypes of* Ixodes *ticks. To detect genotypes NAD MDH isoenzyme genotyping with electrophoresis in polyacrylamide gel was used. Six MDH genotypes carrying 3 alleles existed in* Ixodes *tick populations: 3 monozygous and 3 heterozygous. Ticks with allele 1 (the heaviest one) were attributed to the first genogroups. Their distribution along the area of* Ixodes *— TBEV vectors permitted to reveal the trend of the distribution of 4-th genotype (alles1.3) from west to east, which coincides with the increase of the prevalence of the 3-rd and 1-st TBE virus subtypes. Variations in the tick-genotypes distribution even in the one and the same region might be useful for the forcasting of the circulation of more or less dangerous strains of TBE viruses. The differences in the day and night activity of various tick genotypes were stated also. This might mean that the representatives of different genotypes are able to get blood from different animals preferentially active in the darkness or in the daylight.*

**Key words:** *genotypes of Ixodes ticks, TBEV, subtypes*

Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze как переносчик вируса клещевого или весенне-летнего энцефалита (КЭ) известен с конца 30-х годов XX века (1937 г.), благодаря работам Л.А. Зильбера [6, 11], организовавшего в 1935 г. первую в СССР вирусологическую лабораторию, и работам группы М.П. Чумакова (1940) [10], открывшей вирус. Роль таежных клещей как основы очага КЭ была выяснена благодаря развитию науки вирусологии и огромному числу работ паразитологов, вирусологов, эпидемиологов, прежде всего школы Е.Н. Павловского, изучивших с 1939 г. это опаснейшее заболевание, унесшее не одну сотню людей. В 1938—1939 гг. погиб сотрудник ЗИН Б.И. Померанцев; тяжело болел А.С. Мончадский; М.П. Чумаков остался инвалидом на всю жизнь. Из *Ixodes*

*ricinus* (L.) вирус КЭ был впервые выделен в Белоруссии в 1940 г. [9]. Заболевание до сих пор сохраняет эпидемиологическое значение, несмотря на разработанную систему вакцинации. Работы тех лет выделили 2 самостоятельные нозологические формы КЭ: центрально-европейский или западный КЭ (ЗКЭ — переносчик *I. ricinus*) и дальневосточный (ДВКЭ — переносчик *I. persulcatus*).

Исследования последних 2-х десятилетий с использованием новейших серологических, генетических и молекулярных методик позволяют говорить не только о генетической вариабельности вирусов КЭ, о выделении нескольких десятков штаммов и генотипов, но, по-видимому, и о самостоятельных видах [4, 7], вызывающих различные формы инфекционного процесса у людей. Было установлено, что таежный клещ может служить резервуаром трех субтипов вируса КЭ: дальневосточного, западноевропейского и сибирского [7]. Первое впечатление от карты распространения типов и штаммов вируса КЭ вдоль ареала переносчика на территории России — удивление. Как это может быть? Ведь переносчик везде практически один и тот же — таежный клещ, а большинство штаммов вируса выделено именно из этого вида клещей. Невольно возникает мысль о разнообразии клещей даже в пределах их ареала. Такие подозрения возникали и при исследовании возбудителей других клещевых инфекций (в частности — клещевого боррелиоза). Так, в работе Estrada-Peca и его коллег [17] было показано, что по структуре кутикулы европейские популяции лесного клеща *I. ricinus* могут быть подразделены на несколько групп, часто перекрывающих друг друга. В другой работе [16] тот же автор продемонстрировал, что само распространение этих клещей по ареалу носит характер пятен. Наши наблюдения в северном Прибайкалье показали, что встречаемость зараженных КЭ клещей может колебаться от нуля до 70 % в разных растительных сообществах, расположенных сравнительно недалеко друг от друга территориально (Шашина и др., устное сообщение). Нелишне подчеркнуть, что наиболее существенным из патогенных для человека арбовирусов [13] в странах Евразии (от Испании до Японии) является вирус КЭ. Основные переносчики этого заболевания *I. persulcatus*, *I. ricinus* и *Ixodes hexagonus* Leach [19] паразитируют на мелких млекопитающих и птицах, широко распространенных по всему ареалу этих переносчиков.

Вирус КЭ выделяется в клещах *I. ricinus* на значительных территориях как Восточной, так и Западной Европы, образуя устойчивые многолетние очаги КЭ [15, 26]. В восточной части своего ареала обитания этот вид иксодовых клещей инфицируется также и вирусом весенне-летнего КЭ [8, 12]. Кроме того, вирус КЭ выделялся и из норовых клещей, в частности из *I. hexagonus* [25]). Западная граница ареала *I. persulcatus* находится на Северо-востоке Польши, тогда как ареалы *I. persulcatus* и *I. ricinus* перекрываются на территории России.

Генотипирование таежных и лесных клещей по структуре ДНК носит пока зачаточный характер и не позволяет судить об основах разнообразия даже крупных популяционных блоков этих видов, в то время как изучение методом изоферментного анализа популяционной гетерогенности стало общепризнанным инструментом популяционной генетики и молекулярной биологии [20, 22]. Впервые к проблеме генетического полиморфизма клещевой популяции на примере *I. ricinus* обратился J.A. Healy (1979) [21]. Автору удалось описать 4 аллеля глицерофосфатдегидрогеназы α-GPDH, различающихся по своей электрофоретической подвижности. Важным, как представляется, следует считать установленный факт фенотипического проявления генетической гетерогенности клещевой популяции, что проявляется в различии их локомоторной активности и устойчивости к высыханию.

Дальнейшее исследование этой проблемы привело к изучению гетерогенности популяции *I. ricinus* по локусу другого активного участника метаболических процессов в организме иксодид — фермента малатдегидрогеназы. Использование этого фермента в качестве маркера генетической гетерогенности известно у млекопитающих, включая человека, и у насекомых [18], но для изучения клещей было применено впервые [24]. Обнаруженные 4 аллели не различались по встречаемости среди физиологически различающихся возрастных групп, но достоверно отличались по суточной активности. Таким образом, было доказано, что клещевая популяция генетически гетерогенна по активности в разное время суток, что было подтверждено нами впоследствии на примере *I. persulcatus* [5]. Факт имеет весьма немаловажное значение. Преимагинальные фазы клещей имеют возможность присасываться к прокормителям в разное время суток, а сами хозяева различаются по своей суточной активности, и, как хорошо известно, являются носителями преимущественно различных штаммов вируса, разными порогами титров вируса и разными периодами пригодными для совместного паразитирования отдельных фаз развития клещей на хозяевах, обеспечивающих трансптиальную передачу и дистантный обмен вирусом [1, 2, 3].

Примененный анализ генотипов по энзиму малатдегидрогеназа носит, может быть, более грубый характер, нежели будущий анализ по составу ДНК, но, тем не менее, позволил связать распространение разных субтипов вируса КЭ с распространением по ареалу популяций таежных и лесных клещей, различающихся по этому энзиму, и сравнить их активность в течение суток [5]. Было выявлено 6 МДГ-генотипов: 3 моно- и 3 гетерозиготных, разделенных на 2 геногруппы по наличию (1-я геногруппа) или отсутствию (2-я геногруппа) 1-го, мажорного аллеля, с которым связана, видимо, максимальная активность энзима, одного из существенных вспомогательных компонентов функционирования цикла Кребса — основной энергетической машины организма. Под Санкт-Петербургом, в очаге КЭ в 1998 г. 1-я геногруппа была представлена в основном 1-м, гомозиготным (1.1)

генотипом (64,1 %) от числа всех 267 исследованных клещей.

50 % особей, в которых был найден вирус КЭ, относились именно к этому генотипу. Остальные зараженные клещи были также выявлены среди особей 1-й геногруппы: 4-го (1.3) и 6-го (1.2) генотипов, общая доля которых в популяции составила 24,7 %.

Анализ суточной активности *I. persulcatus* выявил преимущественную дневную и ранненочную активность представителей 1-й геногруппы (рис. 1А), тогда как клещи 2-й геногруппы продемонстрировали очень значительный разброс активности по суткам (рис. 1Б) и, соответственно, возможность получения крови от более широкого круга хозяев.

Как видно из таблицы 1, по мере продвижения на восток число гетерозигот 4-го генотипа растет и параллельно растет встречаемость вируса КЭ в клещах. Вполне вероятно, что клещи именно этого генотипа преимущественно питаются кровью носителей 1-го и 3-го субтипов вируса. В настоящее время разработаны методики определения принадлежности крови того или иного хозяина, полученной на предыдущей фазе развития клеща [14]), что позволяет в ряде случаев связывать принадлежность крови хозяев с частотой встречаемости того или иного возбудителя, как это показали Cadenas с соавторами (2007) [23] в отношении боррелий.

В таблице 2 преобладание западного типа вируса совпадает с преобладанием 1-го генотипа 1-й геногруппы, а Урало-Сибирского — с преобладанием гетерозиготного 4-го генотипа. На рисунке 2 эти тренды обозначены более наглядно. На Куршской косе в Калининградской области в 2005 г. идентифицирован Европейский субтип вируса КЭ, хотя, видимо, как исключение, обнаруживали

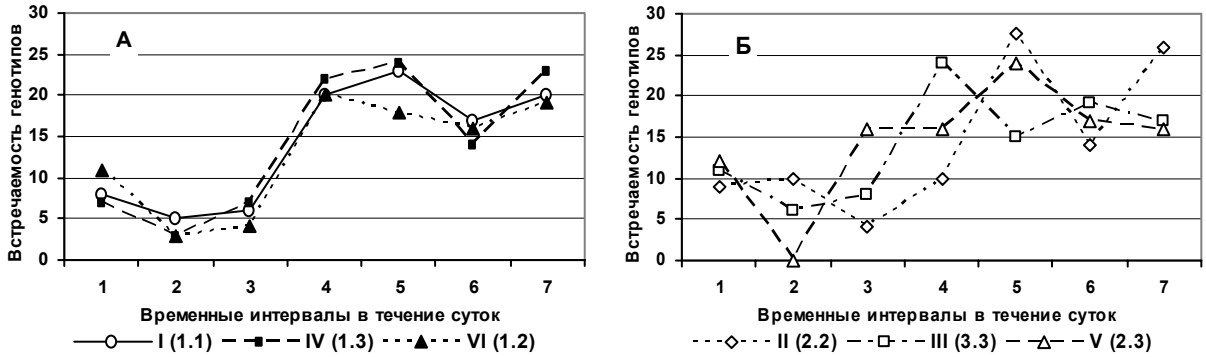


**Рис. 1.** Встречаемость различных генотипов 1-й (А) и 2-й геногруппы (Б) в течение суток. 0–7 – временные интервалы: **1** – $0^{00}$–$4^{00}$; **2** – $4^{01}$–$7^{00}$; **3** – $7^{01}$–$11^{00}$; **4** – $11^{01}$–$14^{00}$; **5** – $14^{01}$–$17^{00}$; **6** – $17^{01}$–$20^{00}$; **7** – $20^{01}$–$23^{59}$.

***Таблица 1***

***Встречаемость различных МДГ генотипов в разных регионах России и зараженность клещей I. persulcatus вирусом КЭ на этих территориях***

| МДГ генотипы и геногруппы | Регионы | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Северо-запад России | | | Сибирь | | Дальний Восток |
| | | | | Западная | Восточная | |
| | В. Новгород (n = 44) | С.-Петербург (n = 1803) | Вологда (n = 189) | Новосибирск (n = 131) | Иркутск (n = 154) | Владивосток (n = 187) |
| ***1-я геногруппа с аллелью 1*** | | | | | | |
| 1 (1.1) | 68,20 | 64,30 | 36,0 | 11,45 | 39,0 | 35,0 |
| 4 (1.3) | 13,60 | 21,18 | 35,0 | 36,64 | 38,0 | 47,0 |
| 6 (1.2) | 13,60 | 3,42 | 11,0 | 22,14 | 11,0 | 6,0 |
| ***2-я геногркппа без аллели 1*** | | | | | | |
| 2 (2.2) | 2,30 | 3,42 | 8,0 | 8,40 | 4,0 | 3,0 |
| 3 (3.3) | 0 | 4,26 | 2,0 | 16,03 | 3,0 | 4,0 |
| 5 (2.3) | 2,30 | 3,42 | 8,0 | 5,34 | 5,0 | 4,0 |
| Встречаемость вируса КЭ | 0,5 (7 из 1330) | 1,2 (35 из 2826) | 2,3 (5 из 221) | 4,5 (4 из 106) | 1,5–10,0 | 3,6 |
| Метод идентификации вируса | Пулы из 10 клещей на сосунках белых мышей (Федорова и др., 1984) | РНИФ и ПЦР, собственные данные (1992–2000) | РНИФ, Рыбакова, персональное сообщение (2001–2003) | РНИФ, собственные данные (2000) | РНИФ и ПЦР (Злобин, Горин, 1996) | РНИФ и ПЦР (Болотин, 1999, 2004) |

*Таблица 2*

***Сравнение генетического состава популяций клещей I. persulcatus по МДГ-маркеру с гетерогенным составом популяций вируса КЭ на территории России***

| Генотипы клещей и вирусов | Встречаемость в разных регионах | | Разница во встречаемости (число раз) | Ковариантная корреляция |
|---|---|---|---|---|
| | Северо-Западный | Сибирско-Дальневосточный | | |
| 1 (1.1) МДГ-генотип | 50,8 (20310 | 28,3 (472) | < 1,8 | 42,750 |
| Вирус группы 2 – Западный, Neudoerf | 7,1 (28) | 3,3 (89) | < 2,1 | |
| 4 (1.3) МДГ-генотип | 21,2 (2031) | 41,1 (472) | > 1,94 | 72,635 |
| Вирус группы 3 – Урало-Сибирский, Лесопарк | 35,7 (28) | 43,0 (89) | > 1,2 | |

**Примечание:** в скобках – число клещей, исследованных по МДГ-маркеру (собственные данные) и данные по встречаемости разных генотипов (видов) вирус КЭ (Злобин В.И., Горин О.З., 1996)

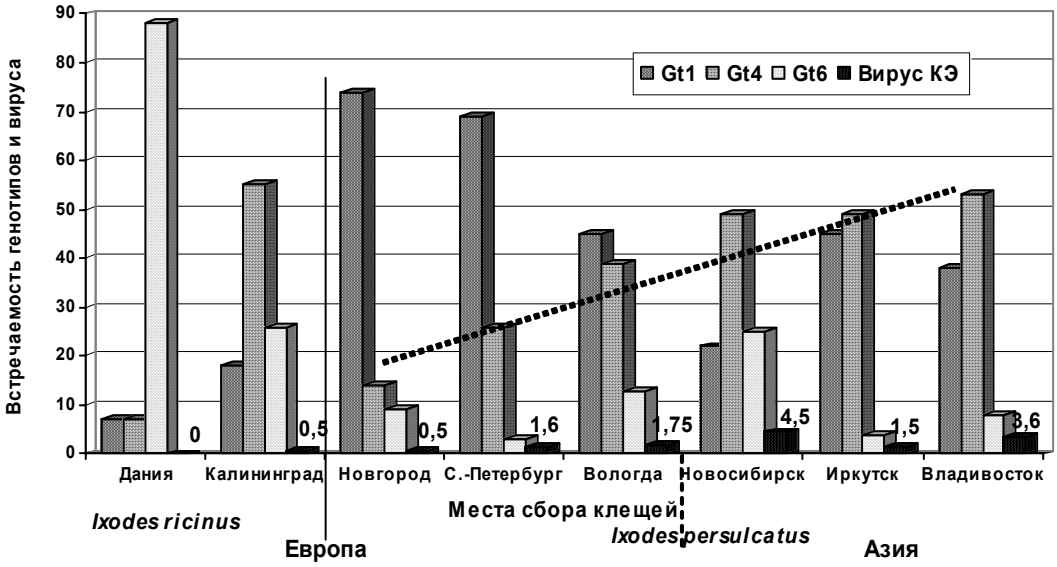


**Рис. 2.** Распространенность МДГ-генотипов и встречаемость вируса КЭ по ареалу клещей рода *Ixodes*. Генотипы: Gt1 – 1-й, Gt4 – 4-й, Gt6 – 6-й.

и дальневосточный [штамм Преголя (Злобин, Горин, 1996 [7])]. В Дании, где абсолютно преобладают *I. ricinus* 2-й геногруппы, вирус КЭ до сих пор выявить не удалось.

Пока трудно судить, в какой мере метод энзимогенотипирования пригоден для предсказания встречаемости тех или иных субтипов вируса КЭ; однако анализ состава отдельных, более или менее изолированных популяций клещей этим методом в сопоставлении с временным фактором активности основных прокормителей клещей, характерных для той или иной территории, может оказаться весьма полезным для дешифровки причин «пестроты» по составу штаммов возбудителей КЭ и, возможно, для оценки опасности отдельных местообитаний переносчиков КЭ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев А.Н. Обмен вирусом клещевого энцефалита между иксодовыми клещами, совместно питающимися на животном с подпороговым уровнем вирусемии / А.Н. Алексеев, С.П. Чунихин // Мед. паразитол. — 1990б. — № 2. — С. 48—50.

2. Алексеев А.Н. Обмен вирусом между питающимися клещами при отсутствии вирусемии у позвоночного хозяина (дистантная передача) / А.Н. Алексеев, С.П. Чунихин // Мед. паразитол., 1991. — № 2. — С. 50—54.

3. Алексеев А.Н. Экспериметальное доказательство обмена вирусом клещевого энцефалита через слюну иксодид (трансптиальный путь передачи) / А.Н. Алексеев, С.П. Чунихин // VI Всес. совещ. по пробл. теоретич. и приклад. акарол.: Тез. докл., Ашхабад, 1990. — Л., 1990а. — С. 8—9.

4. Вотяков В.И. Клещевые энцефалиты Евразии. Вопросы экологии, молекулярной эпидемиологии, нозологии, эволюции / В.И. Вотяков, В.И. Злобин, Н.П. Мишаева. — Новосибирск: Наука, 2002. — 438 с.

5. Выявление генотипической неоднородности популяции *Ixodes persulcatus Schulze* (Acarina: Ixodidae) Северо-запада России и особенности распределения клещевых патогенов — возбудителей болезни Лайма и эрлихиозов в различных генотипах) / А.В. Семенов, А.Н. Алексеев, Е.В. Дубинина и др. // Мед. паразитол., 2001. — № 3. — С. 11—15.

6. Зильбер Л.А. Весенний (весенне-летний) эндемичный клещевой энцефалит // Арх. биол. наук. — 1939. — Т. 56, Вып. 2. — С. 9—37.

7. Злобин В.И. Клещевой энцефалит: Этиология. Эпидемиология и профилактика в Сибири / В.И. Злобин, О.З. Горин. — Новосибирск: Наука, Сибирская издат. фирма РАН, 1996. — 177 с.

8. Специфическая реактивность кДНК- и дезоксиолигонуклеотидных зондов, комплементарных геному вируса клещевого энцефалита, с РНК штаммов различного географического происхождения / В.И. Злобин, В.А. Шаманин, А.Г. Плетнев и др. // Вопр. вирусол., 1992. — № 5—6. — С. 248—252.

9. Чумаков М.П. Клещ *Ixodes ricinus* как переносчик клещевого (весенне-летнего) энцефалита / М.П. Чумаков, Г.А. Найденова // Мед. паразитол. — 1944. — Т. 13, № 4. — С. 376—379.

10. Чумаков М.П. Клещевой эндемичный весенне-летний энцефалит в Европейской части СССР и Западной Сибири // Зоол. журн. — 1940. — Т. 19, № 2. — С. 335.

11. Этиология весенне-летнего эпидемического энцефалита / Е.М. Левкович, А.К. Шубладзе, М.П. Чумаков, В.Д. Соловьев // Арх. биол. наук, 1938. — Т. 52, Вып. 1. — С. 162—183.

12. Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks / M. Labuda, V. Danilova, L.D. Jones, P.A. Nuttal // Med. Vet. Entomol. — 1993. — Vol. 7. — P. 339—342.

13. Detection of an arbovirus in an invertebrate and a vertebrate host using the PCR / V.K. Ward, A.C. Marriott, T.F. Booth et al. // J. Virol. Methods, 1990. — Vol. 30. — P. 291—300.

14. Detection of animal reservoirs of tick-borne zoonoses in Europe / B. Pichon, A. Estrada-Peca, O. Kahl et al. // IJMM, 2006. — Vol. 296, S1, Suppl. 40. — P. 129—130.

15. Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in ticks (Ixodes ricinus) by the PCR / C. Ramelow, J. Suss, D. Berndt // J. Virol. Methods. — 1993. — Vol. 45. — P. 115—119.

16. Estrada-Peca A. Understanding the relationships between landscape connectivity and abundance of *Ixodes ricinus* ticks // Exp. Appl. Acarol. — 2002. — Vol. 28. — P. 239—248.

17. Estrada-Peca of cutucular hydrocarbons and phenotype discrimination of Ixodes ricinus population (Acarina: Ixodidae) from Europe / A. Estrada-Peca, J.S. Gray, O. Kahl // Exp. Appl. Acarol. — 1996. — Vol. 20. — P. 457—467.

18. Genetic variation in natural population of five Drosophila species and the hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphisms / F.J. Ayala, M.L. Tracey, L.G. Barr, J.F. McDonald et al. // Genetics. — 1974. — Vol. 77. — P. 343—384.

19. Genomic sequence of the structural of the structural proteins of louping ill virus: comparative analysis with tick-borne encephalitis virus / S.Y.W. Shiu, M.D. Ayres, E.A. Gould et al. // Virology. — 1991. — Vol. 180. — P. 411—415.

20. Harris H. The principles of human biochemical genetics. — 2nd Ed. North Holland. — Amsterdam, 1975. — 402 p.

21. Healy J.A. Analysis of б-glycerophosphate dehydrogenase variability in the tick Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) // Genetica. — 1979. — Vol. , N 1. — P. 19—30.

22. Hopkinson D.A. Recent work on isoenzymes in man // Ann. Rev. Genet. — 1971. — Vol. 5. — P. 5—16.

23. Host blood meal source identification and Borrelia burgdorferi sensu lato infection in Ixodes ricinus ticks collected on the south- and north-facing slopes of Chaumont (Switzerland) / F.M. Cadenas, O. Rais, J. Moret, L. Gern // IX Intern. Jena Symposium on tick-borne diseases. — 2007. Abstracts. — P. 108.

24. Jensen P.M. Diurnal activity of *Ixodes ricinus* in Denmark, Part II: Aspects of physiological age and genotypic interaction influencing diurnal activity / P.M. Jensen, U. Kaufmann, L. Smirnova // Seasonal and geographical variations in the abundance of *Ixodes ricinus* and Lyme borreliosis transmission in Denmark. Part II, Kopenhagen, 1998. — KVL. — 18 p.

25. Radda A. Die Zeckenenzephalitis in Europa: Geographische Verbreitung und Okologie des Virus // Z. Angew. Zool., 1973. — Vol. 60. — P. 409—461.

26. Tick-borne encephalitis virus (TBEV)-specific RT-PCR for characterization of natural foci of TBE and for other applications / J. Suss, P. Beziat, C. Ramelow, O. Kahl // Zentrabl. Bacteriol., 1998. — Vol. 286. — P. 125—138.