

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения  
Российской академии наук

*На правах рукописи*

УДК 591:599.32+59.083:595.421

ЧИЧЕРИНА ГАЛИНА СЕРГЕЕВНА

**РОЛЬ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В  
ПОДДЕРЖАНИИ АНТРОПУРГИЧЕСКОГО ОЧАГА КЛЕЩЕВОГО  
ЭНЦЕФАЛИТА В ЛЕСОПАРКОВОЙ ЗОНЕ НОВОСИБИРСКОГО  
НАУЧНОГО ЦЕНТРА**

03.02.04– зоология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. Бахвалова В. Н.

Новосибирск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	стр.
<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	5
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ....</b>	13
1.1. Значение иксодовых клещей в циркуляции ВКЭ	16
1.1.1. Типы паразитирования и фауна иксодовых клещей Западной Сибири	16
1.1.2. Экология иксодовых клещей Новосибирской области.....	17
1.1.3. Роль иксодовых клещей в циркуляции ВКЭ.....	21
1.2. Значение мелких млекопитающих в паразитарной системе клещевого энцефалита.....	24
1.3. Генетические и фенотипические свойства ВКЭ, хозяин-зависимая изменчивость.....	30
1.3.1. Строение ВКЭ.....	30
1.3.2. Географическое распространение и генетическое разнообразие КЭ.....	33
1.3.3. Хозяин-зависимые изменения ВКЭ.....	38
1.4. Краткая физико-географическая характеристика Приобской лесостепи	40
1.5. Стационарный участок.....	42
<b>Глава 2.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	44
2.1. Методы исследования.....	44
2.1.1. Зоолого-паразитологические методы.....	44
2.1.2. Вирусологические методы .....	46
2.1.3. Иммунологические и серологические методы .....	48
2.1.4. Молекулярно-генетические методы .....	49
2.1.5. Статистический анализ.....	52
2.2. Материалы исследования.....	52
2.2.1. Зоолого-паразитологические исследования .....	52
2.2.2. Иммунологические и серологические исследования .....	53
2.2.3. Вирусологические и молекулярно-генетические исследования .....	54
2.2.4. Детекция ВКЭ и противовирусных антител в лабораторном эксперименте в процессе персистенции возбудителя в организме	

естественных хозяев.....	55
<b>2.3. Природно-географическая характеристика территории исследования.....</b>	<b>56</b>
<b>Глава 3. ЧИСЛЕННОСТЬ И ВИРУСОФОРНОСТЬ ВКЭ <i>IXODES PERSULCATUS</i> И <i>IXODES PAVLOVSKYI</i> В АНТРОПУГРИЧЕСКОМ ОЧАГЕ.....</b>	<b>58</b>
<b>3.1. Динамика численности сообщества иксодид.....</b>	<b>58</b>
<b>3.1.1. Показатели численности и биотопические особенности распределения пастбищных иксодид на территории ННЦ.....</b>	<b>60</b>
<b>3.2. Вирусифорность пастбищных иксодовых клещей <i>I. persulcatus</i> и <i>I. pavlovskyi</i>.....</b>	<b>64</b>
<b>3.3. Молекулярное типирование ВКЭ в клещевых суспензиях и органах пассажных НЛМ.....</b>	<b>66</b>
<b>3.3.1. В случаях с клинической картиной заболевания.....</b>	<b>66</b>
<b>3.3.2. В случаях с отсутствием клинической картины заболевания.....</b>	<b>67</b>
<b>Глава 4. МЕЛКИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИЕ – ПРОКОРМИТЕЛИ КЛЕЩЕЙ И ЕСТЕСТВЕННЫЕ ХОЗЯЕВА ВКЭ.....</b>	<b>70</b>
<b>4.1. Численность сообщества мелких млекопитающих.....</b>	<b>70</b>
<b>4.2. Пораженность мелких млекопитающих преимагинальными фазами развития иксодовых клещей.....</b>	<b>74</b>
<b>4.3. Уровень серопозитивности мелких млекопитающих.....</b>	<b>78</b>
<b>4.4. Детекция ВКЭ у мелких млекопитающих.....</b>	<b>81</b>
<b>4.5. Результаты молекулярного типирования изолятов РНК ВКЭ в органах млекопитающих.....</b>	<b>82</b>
<b>Глава 5. СЕЛЕКТИВНОЕ ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЗМА МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ФОРМИРОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО СОСТАВА ВИРУСА .....</b>	<b>84</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>87</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>90</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>91</b>

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

экз./флаго-км – экземпляров на флаго-км

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита

ННЦ – Новосибирский научный центр

LD<sub>50</sub> – летальная доза для 50% животных

СГТ – средний геометрический титр

НЛМ – нелинейные лабораторные мыши

Сиб – сибирский генетический тип ВКЭ

ДВ – дальневосточный генетический тип ВКЭ

Евр – европейский генетический тип ВКЭ

АТ – антитела

АГА АТ – антигемагглютинирующие антитела

ВН АТ – вируснейтрализующие антитела

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

РГА – реакция гемагглютинации

ИФА – иммуноферментный анализ

ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Ио – индекс обилия

Ив – индекс встречаемости

Ипп – показатель прокормления

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Клещевой энцефалит (КЭ) – одна из самых распространенных и опасных природно-очаговых инфекций лесной зоны Евразийского континента (Погодина и др., 2007). Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), являясь возбудителем трансмиссивной инфекции, вызывает у человека заболевание, характеризующееся лихорадкой, интоксикацией и поражением центральной нервной системы (Аитов и др., 2007).

Природные очаги КЭ обнаружены в России, во многих Европейских странах, а так же в КНР, КНДР, Японии и Монголии. Вирус КЭ отмечен в лесных биотопах самых различных географо-ландшафтных зон - от лесотундры до субтропиков. На территории России в соответствии с характером и географическим распространением лесного ландшафта выделяют несколько типов очагов, приуроченных к темнохвойной тайге, смешанным лесам, широколиственным лесам, лесостепи (Пшеничнов и др., 1977). В природных очагах устойчивость паразитарной системы КЭ обеспечивается за счет разнообразия путей передачи и фенотипических перестроек вируса при адаптациях к позвоночным и беспозвоночным хозяевам (Цилинский, 1988).

На территории России циркулируют три основных, широко распространенных, генетических типа вируса КЭ: дальневосточный (ДВ), сибирский (Сиб) и европейский (Евр) (Погодина и др., 1986; Esker, 1999; Вотяков и др., 2002). Летальность и частота персистентных форм инфекции существенно отличаются у разных генотипов ВКЭ. Уровни смертельных исходов от общего числа инфицированных лиц достигают 20-60% для ДВ типа, Сиб 6-8% и Евр 1-2%. Инфекция КЭ сибирского типа чаще других генетических типов вируса переходит в хроническую форму (Gritsun et al., 2003). В последнее время получены данные о циркуляции на территории Сибири (Иркутская область) еще двух генетических типов: генотипа 4 – одиночный штамм 178-79 и генотипа 5 – группа вирусов, в состав которых входит штамм 886-84. Оба генетических типа

содержали РНК политиповых штаммов (Злобин и др., 2001а; Злобин и др., 2001б; Демина и др., 2009).

Каждый из генотипов вируса, как правило, доминирует на определенной территории, где в тоже время могут циркулировать минорные генетические типы, в связи с чем ареалы существования генотипов перекрываются (Верхозина и др., 2007; Андаев и др., 2012; Сидорова и др., 2012; Mikryukova et al., 2014). Считается, что существование минорных генотипов ВКЭ вызвано мутациями, а циркуляция политиповых вариантов обусловлена взаимодействием генотипов вируса между собой (Погодина и др., 2007; 2012; Norberg et al., 2013). В последнее время получены данные о смене доминирующих генетических типов ВКЭ в ряде регионов (Погодина и др., 2005; Локтев, 2007; Чаусов, 2009). Спектр генотипов, их соотношение и взаимодействие в природных очагах, а также биологические свойства вируса на эндемичных территориях имеют большое значение в области здравоохранения.

Ранее были описаны два типа ВКЭ, для которых основными резервуарами являются иксодовые клещи: лесной *Ixodes ricinus* L., 1759 (европейский или «рицинусный» субтип) и таежный *I. persulcatus* P. Sch., 1930 (дальневосточный или «персулькатусный» субтип) (Holzmann et al., 1992). В отличие от лесного клеща, обитающего в Европе и европейской части России, таежный клещ многочислен на остальной территории нашей страны, и, в частности, в лесостепном Приобье Новосибирской области (Сапегина и др., 1985; Коренберг, 1989). В последние годы в городских и пригородных биотопах Новосибирска и Томска отмечен значительный рост численности филогенетически близкого вида таежного клеща – клеща Павловского *I. pavlovskyi* Rom., 1946 (Романенко, 2005; 2009а; 2009б; Bakhvalova et al., 2011; Бахвалова и др., 2013; Якименко и др., 2013; Чичерина и др., 2015). Иксодовые клещи паразитируют более чем на 200 различных видах позвоночных. Основными хозяевами имаго иксодид служат в основном средние и крупные млекопитающие (у клеща Павловского в основном птицы), для преимагинальных фаз – мелкие млекопитающие, которым

исследователи отводят роль одного из основных факторов устойчивости очага КЭ (Коренберг, Ковалевский, 1981; Чунихин, 1990), и птицы.

Значительно возросшая в последнее десятилетие численность иксодовых клещей на территории лесопарка Новосибирского научного центра (ННЦ), а также изменение в структуре доминирования сообщества (становление содоминантом *I. pavlovskyi*) могут приводить к изменению в структуре антропургического очага КЭ. В связи с этим требуется уточнение видового состава прокормителей преимаго иксодид из числа мелких млекопитающих, которые являются резервуарными хозяевами вируса КЭ. Необходимо выяснить, как повлияют изменения, произошедшие в паразитарной системе КЭ, на фенетические и генетические свойства вируса.

**Степень разработанности темы.** Следует отметить, что существует большое количество работ, посвященных изучению компонентов природных очагов КЭ. Мониторинг паразитарной системы антропургического очага КЭ на территории ННЦ ведется сотрудниками ИСиЭЖ СО РАН более 30 лет. За этот период был изучен видовой состав беспозвоночных и позвоночных резервуарных хозяев вируса КЭ. Спонтанную зараженность таежного клеща исследовали, в основном, методом биологической пробы на мышах, что позволяло выделять только патогенные варианты ВКЭ.

Наша работа направлена на изучение трансформации структуры сообщества иксодовых клещей, оценки изменения роли участия в прокормлении личинок и нимф из числа мелких млекопитающих, а также на комплексное: вирусологическое, серологическое и молекулярно-генетическое изучение фенетических и генетических свойств вируса КЭ в естественных условиях в случае двух типов резервуарных хозяев.

**Цель:** оценка изменения роли иксодовых клещей и их прокормителей из числа мелких млекопитающих в поддержании природного очага КЭ на территории Новосибирского научного центра в современный период.

Для достижения данной цели были поставлены *задачи*:

1. Провести анализ динамики численности и биотопической приуроченности двух видов иксодовых клещей в антропургическом очаге;
2. Проанализировать динамику численности мелких млекопитающих с оценкой их участия в прокормлении преимагинальных фаз иксодовых клещей;
3. Исследовать спонтанную зараженность вирусом клещевого энцефалита голодных имаго *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* с помощью комплекса вирусологических, серологических и молекулярно-генетических методов;
4. Комплексно изучить спонтанную зараженность вирусом клещевого энцефалита массовых видов мелких млекопитающих;
5. Изучить роль красной полевки и полевой мыши в селекции отдельных генотипов вируса клещевого энцефалита после экспериментального заражения клещевыми суспензиями, содержащими вирус клещевого энцефалита сибирского и дальневосточного генотипов.

**Научная новизна.** На территории лесопарка ННЦ проведен анализ распределения двух видов иксодовых клещей по биотопам. В связи с изменением структуры сообщества иксодовых клещей уточнен видовой состав их прокормителей (мелких млекопитающих). Продолжено изучение спонтанного вирусоносительства КЭ иксодид и мелких млекопитающих с применением современных молекулярно-генетических методов. Установлена циркуляция трех генетических типов ВКЭ: Сиб-ВКЭ, ДВ-ВКЭ и Евр-ВКЭ в виде моно- и смешанной инфекции. Экспериментальное исследование на фоновых видах млекопитающих (красной полевки и полевой мыши) показало, что при одновременном введении двух генетических типов Сиб-ВКЭ и ДВ-ВКЭ их совместное присутствие в положительных пробах крови, головного мозга и селезенки было крайне редким. Чаще всего в таких пробах детектировали только один из генотипов РНК ВКЭ. Генетический состав ВКЭ претерпевал перестройки в зависимости от характера инфекции, а также от видовой принадлежности хозяина.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты, полученные в данной работе, важны не только для адекватного представления об естественной генетической вариабельности и фундаментальных закономерностях эволюции ВКЭ, но и необходимы для решения практических вопросов, связанных с диагностикой и профилактикой инфекции ВКЭ в медицине.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Значительно возросшая в последнее десятилетие численность иксодовых клещей на территории лесопарка ННЦ, а также становление содоминантом *I. pavlovskyi* привело к изменению состава прокормителей клещей: помимо красной полевки и обыкновенной бурозубки одним из основных прокормителей становится полевая мышь.
2. При спонтанной инфицированности антиген Е, РНК и патогенный для лабораторных мышей вирус КЭ чаще встречается у *I. pavlovskyi*, тогда как у *I. persulcatus* чаще встречается только РНК ВКЭ. У красной полевки достоверно чаще детектировали антиген Е, РНК и патогенный для лабораторных животных вирус КЭ, чем у полевой мыши.
3. Анализ генетического состава РНК вируса клещевого энцефалита в период персистентной инфекции показал возможное действие селективного отбора дальневосточного генотипа ВКЭ у красной полевки и не выявил такового у полевой мыши.

**Степень достоверности результатов.** Для определения достоверности результатов работы использованы современные методы подготовки образцов. Используемая для проведения исследований методическая база соответствует поставленным задачам. Для статистической обработки полученного материала применены корректные статистические методы анализа.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: Первая Всероссийская молодежная научная конференция, посвященная 125-летию биологических исследований в ТГУ «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии» (г. Томск, 2010); XV Симпозиум с международным участием «Сложные системы в экстремальных условиях» (г. Красноярск, 2010); Научная конференция «Фундаментальные науки – медицине» (г. Новосибирск, 2010); 8-е Межрегиональное совещание энтомологов Сибири и Дальнего Востока с участием зарубежных ученых (г. Новосибирск, 2010); Международная конференция «Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями» (г. Санкт-Петербург, 2010); VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика–2010» (г. Москва, 2010); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современные аспекты природной очаговости болезней» (г. Омск, 2011); II International conference “Physico-Chemical Biology” dedicated to the 85<sup>th</sup> anniversary of academician Dmitri G. Knorre (Novosibirsk, 2011); X съезд Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации» (г. Москва, 2012); Первая Всероссийская конференция «Гетерогенность популяций бактерий и вирусов и ее отражение в эпидемиологии и клинике инфекционных болезней» (г. Владивосток, 2013); Международная научная конференция, посвященная 135-летию Томского Государственного университета, 125-летию кафедры зоологии позвоночных и экологии и Зоологического музея и 20-летию научно-исследовательской лаборатории биоиндикации и экологического мониторинга ТГУ (г. Томск, 2013); Международная научная конференция «Актуальные аспекты природной очаговости болезней, посвященная 75-летию теории академика Е. Н. Павловского о природной очаговости болезней» (г. Омск, 2014).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 23 работы, в том числе 4 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК; 12 – в материалах международных конференций; 7 – в журналах и республиканских сборниках научных статей, материалах Всероссийских и межрегиональных научных конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, трех глав собственных результатов, заключения, выводов и списка использованной литературы (154 отечественных и 36 зарубежных источников). Объем рукописи составляет 114 страниц машинописного текста и включает 9 таблиц и 10 рисунков.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю – к.б.н., с.н.с. лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН В.Н. Бахваловой; д.б.н., О.В. Морозовой (ФГБУ НИИ вирусологии им. И. Ивановского Минздрава РФ); д.б.н., профессору В.Н. Романенко (ФГБОУ высшего профессионального образования «Национальный исследовательский ТГУ»); к.б.н., с.н.с. лаборатории экологии сообществ позвоночных животных В.В. Панову; н.с. лаборатории структуры и динамики популяций животных О.Ф. Потаповой.

Работа выполнена в лаборатории патологии насекомых Института систематики и экологии животных (ИСиЭЖ) СО РАН. Работу с инфекционным ВКЭ и потенциально опасным биологическим материалом выполняли в режимном блоке лаборатории, аттестованном 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 05.03.2008 г.). Постановку ОТ-ПЦР осуществляли на базе ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск) совместно с д.б.н. О. В. Морозовой. Определение и анализ нуклеотидных последовательностей выполнен в Центре секвенирования ДНК СО РАН.

Основной сбор полевого материала для исследований, определение видовой принадлежности, пола и возраста мелких млекопитающих на стационарном участке осуществлял к.б.н. ИСиЭЖ СО РАН В.В. Панов, любезно предоставивший для анализа также данные по численности клещей и мелких млекопитающих.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) вызывает вирусную инфекцию, поражающую оболочку, белое и серое вещество и другие отделы головного и спинного мозга ЦНС, корешки спинномозгового нерва и периферические нервы, приводящую к развитию парезов и параличей (Львов, 2008). Взаимодействие вируса и организма происходит в различных формах, в зависимости от свойств вируса и особенностей хозяина. Формы взаимодействия организма хозяина и вирусного агента, по классификации В. А. Зуева (1979), прежде всего, подразделяются на два главных типа, в зависимости от продолжительности пребывания вируса в организме.

При первом типе взаимодействия вирус пребывает в организме непродолжительное время, что выражается в двух формах инфекционного процесса.

1. Острая инфекция – взаимодействие вируса с организмом непродолжительное время, характеризующееся коротким периодом инкубации с последующим развитием характерной данному заболеванию клинической картиной. Исход острой инфекции – частичное или полное выздоровление с элиминацией вируса и приобретением иммунитета или смерть.
2. Инаппарантная инфекция – бессимптомная инфекция с непродолжительным пребыванием вируса в организме. После освобождения организма от вируса о его пребывании судят по появлению или повышению титра специфических антител в крови.

Второй тип взаимодействия вируса и организма, характеризуется длительным пребыванием вируса в организме – персистенцией. Отсюда понятно, что все формы этого взаимодействия отличаются длительным вирусоносительством, которое, однако, может различаться по своим проявлениям и последствиям.

1. Персистентная инфекция – бессимптомная персистенция вируса, при которой имеет место репродукция инфекционного вируса во внешне здоровом

организме. Эта форма инфекции может поддерживаться в организме после выздоровления.

2. Латентная инфекция – бессимптомная персистенция вируса, при которой нарушен полный цикл вирусной репродукции, и в клетках хозяина вирус присутствует в виде субвирусных структур. Под действием активирующих агентов может происходить активация инфекционного процесса вплоть до острой формы.
3. Хроническая инфекция – персистенция вируса, сопровождающаяся появлением одного или нескольких симптомов заболевания с последующим развитием патологического процесса в течение длительного времени. Течение инфекции характеризуется ремиссиями, перемежающимися с периодами обострения на протяжении нескольких месяцев или даже лет. При своевременно начатом лечении может заканчиваться полным выздоровлением.
4. Медленная инфекция – характеризуется многомесячным или даже многолетним инкубационным периодом, последующим медленным, но неуклонным развитием симптомов заболевания, заканчивающегося тяжелыми расстройствами или смертью. Для медленного типа инфекции характерно развитие патологического процесса в одном органе или системе.

Персистентная форма взаимоотношений вируса и организма неодинакова по своим проявлениям и может переходить из одной формы инфекции в другую (Сморозинцев, Дубов, 1986).

Инфекция КЭ распространена по всей лесной и лесостепной умеренной климатической зоне Евразийского континента. Природные очаги КЭ имеются во всех странах Европы.

Клещевой энцефалит вызывается флавивирусом, относящимся (по ныне действующей классификации вирусов) к группе флавивирусов млекопитающих, передаваемых клещами, входящим в род *Flavivirus*, сем. *Flaviviridae*. Вирус клещевого энцефалита (Tick-Borne Encephalitis Virus) – РНК-содержащий вирус, протяженность РНК составляет 10,5 – 12 тыс. н. к. Представлен тремя основными генетическими типами: сибирским (Сиб), дальневосточным (ДВ) и европейским

(Евр) (Heinz et al., 1999; Hayasaka et al., 1999; Погодина и др., 2004а). На территории Западной Сибири распространены все три генетических типа ВКЭ с абсолютным преобладанием в очагах сибирского генетического типа, который, в свою очередь, представлен в регионе двумя геновариантами – Васильченко и Заусаев – с преимущественным распространением Заусаева (Ткачев, 2015; Бахвалова и др., 2015; Чичерина и др., 2015).

В естественных условиях ВКЭ циркулирует в природных очагах в составе трехчленной паразитарной системы, включающей в себя: вирус, членистоногих хозяев (клещей-переносчиков) и позвоночных хозяев (прокормителей клещей). Процесс постоянного взаимодействия популяции возбудителя с популяциями естественных носителей, переносчиков и внешней средой, обеспечивающий его существование, и представляет собой эпизоотический процесс (Литвин, Коренберг, 1999).

В настоящее время известно более 850 видов древних членистоногих – клещей, которые относятся к семейству Ixodidae. Ныне существующий род *Ixodes*, входящий в состав семейства иксовых клещей, сформировался ко второй половине триасового периода (около 200 млн. лет назад) (Вершинский, 1984). На территории России встречается около 60 видов в составе пяти родов (Балашов, 1998). На территории Западной Сибири – 12 видов (Сапегина и др., 1985; Добротворский и др., 1994; Богданов, 2006; Якименко и др., 2013).

К кровососущим членистоногим, ведущим паразитический образ жизни, относятся все активные фазы, прокармливающиеся на позвоночных хозяевах. При этом, млекопитающие занимают второе место после птиц по разнообразию видового состава прокормителей. Всего их 129 видов, относящихся к 5 отрядам: насекомоядных, зайцеобразных, грызунов, хищных и копытных (Наумов, 1957; Чабовский, 1967; Таежный клещ..., 1985; Андреева, Андреева, 2004; Балашов, 2004; Ефремова, Якович, 2009).

## 1.1 . Значение иксодовых клещей в циркуляции ВКЭ

### 1.1.1. Типы паразитирования и фауна иксодовых клещей Западной Сибири

Семейство иксодовых клещей (Ixodidae) представлено двумя подсемействами (Ixodinae и Amblyomminae), 14 родами и включает около 680 видов. Подсемейство Ixodinae включает единственный род *Ixodes* (Балашов, 1998).

Все иксодовые клещи – облигатные временные паразиты позвоночных животных со сложным циклом развития, слагающимся из трех активных фаз – личинки, нимфы, имаго и одной неактивной – яйца (Балашов, 1967). Каждая активная фаза развития клещей питается однократно, но каждый акт питания занимает несколько суток. Во время питания происходит увеличение массы тела и морфолого-физиологические перестройки. Большинство видов иксодид после питания покидают тело хозяина, и все дальнейшее развитие происходит во внешней среде в почве, гумусовой подстилке или норах хозяев. С питанием активных фаз иксодовых клещей связаны периоды существования «свободного» и паразитического. По числу сменяемых хозяев и месту линек жизненные циклы клещей могут включать трех, двух или одного хозяина. По характеру связей с прокормителями и типами местообитаний иксодид разделяют на виды с пастбищным подстерегающим и гнездово-норовым (убежищным) типами паразитизма (Беклемишев, 1998).

Для большинства видов иксодовых клещей, в частности, для всех иксодид Западной Сибири, характерен треххозяинный цикл развития (Якименко и др., 2013).

В Западной Сибири отмечают существование 12 видов иксодовых клещей, из которых три вида с гнездово-норовым (*Ixodes apronophorus* P.Sch., 1924; *I. crenulatus* Koch., 1844; *I. lividus* Koch., 1894), один вид со смешанным (*I. trianguliceps* Bir., 1895) и 8 видов с пастбищно-подстерегающим (*I. persulcatus* P. Sch. 1930; *I. pavlovskyi* Pom., 1946; *Dermacentor reticulatus* Fabr., 1894; *D.*

*marginatus* Sulz., 1776; *D. silvarum* Ol., 1931; *D. nuttalli* Ol., 1929; *Haemaphysalis concinna* Koch., 1844 и *H. pospelovaeshromae* Hoog., 1966) типами паразитирования (Якименко и др., 2013). Основными переносчиками возбудителей природно-очаговых инфекций в Западной Сибири служат клещи трех видов – *I. persulcatus*, *D. reticulatus* и *D. marginatus*, имеющих в регионе широкое распространение. На территории Новосибирской области в качестве эпидемически значимого переносчика до недавнего времени указывали только *I. persulcatus* (Сапегина и др., 1985; Коренберг, 1989; Добротворский и др., 1994; Богданов, 2006; Якименко и др., 2013).

Все имаго с пастбищно-подстерігающим типом паразитирования активно нападают на человека и являются переносчиками многих природно-очаговых инфекций. Среди патологических агентов, переносимых клещами, на территории России и сопредельных государств наибольшее медико-ветеринарное значение имеют: вирусы клещевого энцефалита, Западного Нила и Повассан, омской геморрагической лихорадки, крымской геморрагической лихорадки, кемеровской клещевой лихорадки, а также иксодовые клещевые боррелиозы, риккетсиозы, анаплазмозы, эрлихиозы, туляремия, бабезиозы (Левкович, Погодина, 1967; Sonenshine, 199; Randolph, 2001; Nutall, Labuda, 2003; Андреева, Андреева, 2004; Коломин, 2007; Беспятова и др., 2009; Randolph, 2009; Черноусова и др., 2010). Среди природно-очаговых инфекций вирусной этиологии на территории Западной Сибири с момента открытия и по настоящее время самым опасным для человека является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ).

### **1.1.2. Экология иксодовых клещей Новосибирской области**

Географическое распространение иксодид как временных эктопаразитов зависит от условий окружающей среды, распространения их прокормителей и отражает историю формирования фауны конкретного региона (Балашов, 1967). На численность и вирусофорность клещей влияет обширный комплекс абиотических и биотических факторов, прямо или косвенно определяющих экологию

возбудителя в конкретных ландшафтных условиях (Вершинский, 1984). Среди абиотических факторов ведущая роль принадлежит гигротермическому режиму (Таежный клещ..., 1985; Азарова и др., 1990; Сунцова и др., 2005; Данчинова и др., 2007), значительные изменения которого могут отражаться одновременно в резких колебаниях численности клещей и заболеваемости людей КЭ; сумме температур в июле – октябре; уровню промерзания почвы; количеству осадков; характеру рельефа и растительного покрова (Галимов, 1974; Григорьев, 2007; Коротков, 2005; Коротков и др., 2007; Беспятова и др., 2009; Ясюкевич и др., 2009), а также степени антропогенного воздействия человека на природный очаг (Алемасова и др., 2001; Романенко, 2005; Погодина, Колясникова, 2008).

Широко распространенный вид иксодовых клещей в Западной Сибири – таежный клещ (*I. persulcatus*). Ареал его охватывает среднюю и южную тайгу, подтайгу и северную лесостепь; в горных районах – предгорную лесостепь и весь горно-лесной пояс. Наиболее благоприятными условиями распространения для таежного клеща являются южная тайга и подтайга, особенно смешанные средневозрастные леса; в горной части – сосново-березовые леса и низкогорная черневая тайга (Нецкий и др., 1966; Иголкин и др., 1972; Таежный клещ..., 1985; Якименко и др., 2013). При изучении численности таежного клеща на территории Приобской лесостепи в период 1981 – 1989 гг. А. К. Добротворским (1992) установлена зависимость распределения таежного клеща от биотопических условий местообитания. Так, наибольший показатель обилия имаго таежного клеща характерен для облесенных логов и оврагов ( $16,1 \pm 3,6$ ). Уменьшение обилия прослеживалось от лесов в понижениях рельефа к мелколиственным лесам ( $9,0 \pm 1,8$ ) и далее к лесам с преобладанием сосны ( $0,2 \pm 0,1$ ). Анализ полученных данных позволяет сделать заключение, что ведущим фактором в распределении таежного клеща по территории Приобской лесостепи является режим увлаженности (Добротворский и др., 1994).

Клещ Павловского (*I. pavlovskyi*) известен только в России и Восточном Казахстане. В России ареал состоит из двух частей: западная – Западная и Южная Сибирь, восточная – Дальний Восток. И. И. Богданов (2006) на территории

Западной Сибири отмечал малочисленное существование клеща Павловского в островных лесах и приречных борах. На территории правобережья Оби, в лесах вдоль Оби и ее крупных притоков – Ини, Берди, Чумыша.

Особенностью клеща Павловского по сравнению с таежным клещом является его меньшая требовательность к условиям гигротермического режима окружающей среды. Клещ Павловского, в отличие от таёжного клеща, может успешно развиваться и при небольшом количестве листового опада, не образующем толстую подстилку, в связи с чем успешно распространяется в городских биотопах – в парках, на аллеях (Романенко, 2009б). Высокое обилие вида клеща, способного успешно существовать в неблагоприятных для таёжного клеща городских и пригородных биотопах, может повышать устойчивость природных очагов КЭ. Однако частота нападений клеща Павловского на людей существенно ниже по сравнению с таёжным даже в местах доминирования клеща Павловского (Романенко, Кондратьева, 2011). Такие различия обусловлены особенностями поведения имаго клещей этих видов при ожидании прокормителя. Таёжный клещ поднимается выше и успешнее цепляется за одежду человека, а клещ Павловского ожидает хозяина невысоко от земли и часто может прикрепиться только за обувь, на которой удержаться сложнее. Отличия клещей включают специализацию половозрелой фазы к хозяевам: таёжный клещ прокармливается, в основном, на крупном рогатом скоте, крупных и средних диких млекопитающих, а клещ Павловского – на птицах, реже на зайцах и ежах (Таежный клещ..., 1985). Помимо особенностей поведения и специализации в питании имаго клеща Павловского, у этих двух близкородственных видов существует различие в периоде метаморфоза. Так, полный цикл развития у таежного клеща на территории Западной Сибири – три-четыре года, а у клеща Павловского не более двух лет (Сапегина, 1969).

В природных очагах КЭ на территории Западной Сибири произошли значительные изменения в структуре сообщества иксодовых клещей. По данным Ф. Ф. Бусыгина с соавторами (1984) вначале 80-х гг. в Новосибирской области доминирующим видом иксодид был таежный клещ, а клещ Павловского

встречался в единичных экземплярах. Однако, по данным ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» в 2012 г. клещ Павловского был зарегистрирован в пяти районах Новосибирской области численностью от 2,1 экз./км до 53,0 экз./км.

Аналогичная ситуация прослеживается для городских и пригородных территорий Новосибирска и Томска. Так, в городских парках (искусственные насаждения) и естественных пригородных лесах Томска клещ Павловского встречается совместно с таежным клещом и численность его значительно превышает аналогичные показатели таежного: доля клеща Павловского в населении иксодид варьирует от 42,9 до 100%, а численность в отдельных биотопах достигает 18,5 – 29,9 экз./км (при этом численность таежного не превышает 2,9 – 3,3 экз./км (Романенко, Чекалина 2004; Романенко 2009а, 2009б).

С 2009 г. в Новосибирске и его окрестностях клещ Павловского становится массовым видом и в настоящее время его доля в сообществе иксодовых клещей достигает 70 – 80%, при численности 22,5 – 35,0 экз./км (Малькова и др., 2011; 2012а, 2012б).

Причинами изменения в структуре сообщества иксодид, произошедшими на данных территориях, одни авторы считают: увеличение рекреационной нагрузки и снижение численности средних и крупных млекопитающих, служащих основными прокормителями имаго таежного клеща; восстановление сообщества птиц, в том числе лесных видов, являющихся основными прокормителями клеща Павловского (Академгородок) (Ливанова и др., 2011); также существует мнение, что важная роль в закреплении клеща Павловского на данной территории связана с биологией развития (Якименко и др., 2013).

### 1.1.3. Роль иксодовых клещей в циркуляции вируса клещевого энцефалита

Относительно длительный жизненный цикл клещей делает их идеальными естественными хозяевами ВКЭ. Это подтверждается экспериментально. Так, при заражении *I. persulcatus* вирусом КЭ выявлено интенсивное размножение и накопление патологического агента во всех органах и тканях клеща: наибольшее его количество регистрируется в кишечнике, половом аппарате и слюнных железах, при этом количество вируса в слюнных железах сопоставимо с таковым во всем теле клеща, что обеспечивает возможность заражать животных или человека даже при кратковременном присасывании (Алексеев, 1993; Балашов, 2009). Однократное многодневное питание каждой фазы клеща способствует трансмиссивной передаче возбудителя инфекции не только разным особям прокармливающих иксодид, но и разным видам животных (Балашов, 2009). Способность концентрировать кровь обеспечивает идеальные условия для сохранения и репродукции внутриклеточных вирусов и бактерий, что в совокупности с высоким репродуктивным потенциалом клещей позволяет возбудителям инфекций сохраняться в природе (Балашов, 1998).

Клещи могут обеспечивать не только активную репродукцию ВКЭ, но и его персистенцию, амплификацию и передачу в популяции без участия прокормителей горизонтальным и вертикальным путями. Вертикальная передача вируса происходит трансвариальным путем – от зараженной самки личинкам через яйца, половым – через сперматогонии зараженных самцов в овоциты, затем в яйца и далее – трансвариально в личинки, а также трансфазовым путем – от одной фазы к следующей (Павловский, 1964). Горизонтальная передача может осуществляться половым путем – от самца к самке со спермой и смазкой сперматофора (Чунихин и др., 1983), посредством контактов с вируссодержащей слюной другого клеща (Алексеев, 1971; Алексеев, 1990a), при совместном питании зараженных вирусом и интактных клещей (Алексеев, Чунихин, 1991b; Jones et al., 1987), обратному обмену вирусом между поколениями при совместном питании нимф и личинок (Ходаковский, 1947) и при омовампиризме

(Alekseev, 1992). В свою очередь, ВКЭ также оказывает влияние, стимулируя продукцию гормона линьки и ускоряя развитие векторной части популяции переносчика (Коротков, Буренкова, 2006), увеличивая двигательную активность, усиливает отрицательный и уменьшает положительный гемотаксис (Алексеев и др., 1988), усиливает чувствительность к акарицидам (Семенов, 2003).

Вирусифорность таежного клеща для Западной Сибири в начале 80-х гг. варьировала в пределах 0,7 – 10,5% (Бусыгин и др., 1984). Ежегодное исследование уровня вирусифорности клещей на территории России показало неравномерное распределения зараженных ВКЭ особей от единичных иксодид до 2 – 5% и даже до 33,3%. Так, в Тюменской области в 2003 – 2009 гг. вирусифорность клещей колебалась в среднем от  $3,9 \pm 0,7\%$  до  $7,0 \pm 0,8\%$ . (Колчанова, 2007). В Тыве процент вирусифорных клещей в 2002 г. составил 4,7% по результатам индивидуального исследования и 3,5 % – группового (Буренкова и др., 2008). В Вологодской области зараженность клещей ВКЭ не превышала 4,0% (Лесникова и др., 2008). Зараженность клещей в Ярославской области по данным лаборатории особо опасных инфекций ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в 2008 году сравнительно низкая – в среднем 2,3%. В Республике Алтай (Щучинова, 2008) индивидуальная зараженность клещей собранных с растительности, в период массовой активности в 1992 – 2006 гг., составила  $7,8 \pm 1,9\%$ . О. В. Мельникова с соавторами (2011), исследуя иксодовых клещей на различной удаленности от Иркутска, показали, что уровень вирусифорности клещей в период 2005 – 2009гг. находился на уровне  $1,26 \pm 0,15\%$ . При этом, спонтанная инфицированность клещей, снятых с одежды и тела людей, существенно выше; так, в пробах, приготовленных из этих клещей, ВКЭ обнаруживали в 5–20 раз чаще, чем собранных с растительности (Мельникова и др., 1996; Brmaen et al., 2004; Suss et al., 2004). По данным Л. А. Верета (1975) прослеживается взаимосвязь численности и вирусифорности клещей. Однако данная взаимосвязь наблюдается не всегда (Катин и др., 2001).

К концу XX века становится типичным антропогенное преобразование природных очагов КЭ. В процессе изменения естественных ландшафтов

становятся более заметны изменения в биоценозах. Так, в Карелии в последние десятилетия ведется интенсивная рубка леса. На смену малоблагоприятным условиям существования таежного клеща – коренным хвойным и еловым лесам, – приходят естественные лесовозобновления с молодыми вырубками, которые формируют мозаичные лесные ландшафты, создавая тем самым благоприятные условия для иксодовых клещей и их прокормителей. На этом фоне отчетливо прослеживается значительное увеличение численности таежного клеща в 2 – 2,5 раза по сравнению с 80-ми годами XX в. (Беспятова и др., 2006; Беспятова и др., 2009). Рядом авторов было показано, что уровень антропогенной трансформации ландшафта отражается и на степени спонтанной вирусофорности клещей. В 50 – 60-х годах XX века проведено первое комплексное исследование антропогенно измененных очагов в г. Томске, где преобладали вторичные березово-осиновые леса с островками кедра и сосновые боры. Было установлено, что по мере увеличения антропогенного воздействия вирусофорность клещей значительно возрастала от 2,3 % до 20,5% (Карпов, 1965). В коренных лесах Карелии в 2006 г. вирусофорность клещей составляла 1,8%, на территории подвергнутой незначительной антропогенной трансформации – 12,3%, в пригородных парках и рекреационных лесах г. Петрозаводска – была наивысшей 33,3% (Коротков и др., 2007). Подобная ситуация отмечена для Томска и его окрестностей (Романенко, 2005; 2009а; 2009б; Иванова, 2009). На территории Университетской роши – старейшем искусственно созданном парке города, который по характеру растительного покрова сходен с естественными смешанными лесами юга Томской области, – была отмечена самая высокая вирусофорность личинок и нимф иксодовых клещей – 58,7%. По мере снижения воздействия человека на природу прослеживается падение уровня зараженности иксодид до 45,7%, а в лесных массивах, расположенных в 10 и более км от города и испытывающих самое незначительное антропогенное преобразование, вирусофорность составляла 9,4–4,8% (Романенко, 2005; 2009а; 2009б; Иванова, 2009).

Сравнительные исследования вирусоносительства среди разных видов иксодовых клещей в природных очагах, претерпевающих изменения видового

состава иксодид, немногочисленны (Иванова, 2009; Романенко, Кондратьева, 2011).

К биотическим факторам относят численность и видовой состав мелких млекопитающих; восприимчивость и невосприимчивость животных к вирусу КЭ; иммунизацию (антивирусные антитела и антитела, направленные против антигенов клещей) прокормителей клещей; показатель прокормления нимф; интенсивность эпизоотического процесса в предыдущие 1 – 2 сезона; видовой состав сообщества иксодид; физиологическое состояние и возрастная структура клещевых популяций (Шилова, 1961; Мишаева, Вотяков, 1978; Коренберг, Ковалевский, 1977; Алексеев, 1985; Азарова и др., 1990; Катин и др., 2001; Вотяков и др., 2002).

Таким образом, условия, формирующие уровни зараженности клещей в биоценозах, могут варьировать в широких пределах. Поэтому детальное изучение всех звеньев паразитарной системы необходимо для раскрытия закономерностей функционирования очага.

## **1.2. Значение мелких млекопитающих в паразитарной системе клещевого энцефалита**

В очагах КЭ на территории Западной Сибири (Новосибирская область) наиболее многочисленными являются два вида иксодовых клещей – таежный клещ и клещ Павловского. Жизненные циклы обоих видов иксодовых клещей тесно связаны с млекопитающими. При этом животное выступает не только в качестве донора крови, необходимой для метаморфоза клеща или откладки яиц, но и является резервуаром вируса, осуществляя тем самым распространение его среди клещей в очаге (Сморозинцев, Дубов, 1986). Необходимым условием существования природного очага КЭ является наличие эпидемической цепочки, обеспечивающей существование непрерывной циркуляции вируса в природе. Наиболее простым типом такой цепочки является передача вируса по линии клещ – позвоночное животное – клещ.

Пригодность вида хозяина для питания определяется комплексом морфофизиологических показателей, таких как: размер тела, толщина кожного покрова и уровень противоклещевого иммунитета, от которого зависит способность клеща прикрепиться, напитаться и в последующем перелинять в следующую фазу или отложить яйца. Преимущественный выбор прокормителя часто определяется временными и пространственными пересечениями места обитания клещей и факторами, способствующими встрече с млекопитающими (Балашов, 1998).

Личинки обоих видов клещей активно прокармливаются на большинстве видов мелких млекопитающих (грызуны и насекомоядные), обитающих на территории Новосибирской области. Нимфы обоих видов иксодид большей своей частью прокармливаются на мелких и средних млекопитающих, редко на птицах. Наибольшие экологические различия прослеживаются для имаго: имаго клеща Павловского отличаются много большей орнитофильностью, редко встречаясь на млекопитающих, тогда как основную массу имаго таежного клеща прокармливают крупные дикие и домашние животные (Сапегина и др., 1985; Таежный клещ..., 1985; Якименко др., 2013).

Имеется обширная литература, посвященная изучению восприимчивости к ВКЭ у различных животных и птиц, обитающих в очагах заболеваний. При экспериментальном заражении восприимчивыми к ВКЭ оказались домовые мыши, степные пеструшки, обыкновенные полевки. У некоторых животных (бурундуки, красно-серые полевки, полевые мыши, мыши-малютки) заболевание КЭ протекало бессимптомно, однако вирус сохранялся в их крови и мозге в течение 10 – 30 дней. К ВКЭ восприимчивы некоторые виды сельскохозяйственных животных: овцы, козы, поросята. При заражении восприимчивых животных малыми дозами ВКЭ Е. Н. Левкович с соавторами (1967) наблюдали развитие длительной и напряженной вирусемии (8 – 15 дней). У невосприимчивых животных вирус элиминировал из крови через 1 – 2 дня. Экспериментально был выявлен пороговый уровень инфекциозности арбовирусов с трансмиссивной передачей. Эпизоотическое значение имеет

уровень вирусемии у животных с титрами вируса в крови, соответствующими не менее  $3,0 \text{ IgLD}_{50/0,03\text{мл}}$ . Именно этот уровень позволяет инфицировать 5% личинок и 12% – нимф, поэтому является эпизоотологически значимым (Чунихин, 1990).

Не все животные способны формировать надпороговый уровень вирусемии, что объясняется широким распространением малочувствительных животных в природном очаге инфекции (Алексеев, Чунихин, 1990а), кратковременностью надпороговой вирусемии (Алексеев, 2007), а также свойствами самого вируса, выражающимися в широком распространении в природе штаммов, неспособных вызывать вирусемию (Чунихин, Леонова, 1985; Леонова, 1997). Следовательно, должны существовать иные пути поддержания циркуляции вируса в природном очаге. В 1990 г. С. П. Чунихин с соавторами был выявлен, а в 1993 г. подтвержден Labuda с соавторами дистантный (безвиримийный) путь передачи ВКЭ, при таком пути передачи вирус поступает в клеща с лимфоцитами хозяина – млекопитающего, мигрирующими в очаг воспаления. Поэтому в естественных условиях очага все животные являются резервуаром для заражения клещей ВКЭ.

О широком вовлечении позвоночных животных в циркуляцию ВКЭ в естественных очагах свидетельствуют факты обнаружения в сыворотке крови противовирусных антител в высоких титрах и изоляция вируса КЭ.

Исследование сывороток крови позвоночных на наличие антител против ВКЭ – один из наиболее доступных и распространенных способов исследования контакта животных с вирусом в природных очагах (Окулова, 1986). Из данных ВОЗ реакция торможения гемагглютинации (РТГА) наиболее полно позволяет выявить антитела к флавивирусам, приуроченные к различным классам иммуноглобулинов. Известно, что показатели экспрессии вирусспецифических антител служат отражением состояния функционирования иммунокомпетентных клеток организма, что позволяет оценивать напряженность специфического иммунитета.

Уровень иммунной прослойки мелких млекопитающих в очагах КЭ не одинаков и имеет межгодовые и межсезонные колебания. Так, по данным Г. С. Кисленко и Ю. С. Короткова (1998) при исследовании сывороток, полученных от

мелких млекопитающих, в период 1986 – 1991 гг. в долинных темнохвойных лесах окрестностей с. Большой Кемчук Красноярского края наблюдались межгодовые колебания иммунной прослойки к ВКЭ: у зеленоядных полевок (красно-серой и серой полевок) доля зверьков, содержащих в крови АГА АТ, изменялась от 0 до  $6,1 \pm 2,0\%$ , при этом серонегативные результаты получали три года из шести изучаемых. У полевок со смешанным типом питания (красная и рыжая полевки) уровень серопозитивности к ВКЭ варьировал в пределах от 0 до  $25,8 \pm 7,8\%$ , при этом в течение двух лет антитела обнаружить не удалось. Авторы показывают результаты с очень низким уровнем антител к ВКЭ у полевой мыши  $2,8 \pm 2,0\%$ . Также данными исследователями не были обнаружены антигемагглютинины к ВКЭ у азиатской мыши и 6 видов землероек бурозубок. Л. Д. Щучиновой (2008), при серологическом исследовании образцов крови мелких млекопитающих, собранных на территории Республики Алтай в 1995 – 2007 годах, АГА АТ к АКЭ найдены у  $9,6 \pm 3,2\%$  зверьков.

Считается, что на фоне развития противовирусного иммунитета у животного зверек становится биологическим тупиком для вируса, так как в иммунном организме не развивается вирусемия (Хань Ши-Цзу, Погодина, 1963). Однако в противоположность этому мнению, А. И. Яковлевым с соавторами в 1966 г. в эксперименте на лабораторных мышках после предварительной иммунизации против ВКЭ в ответ на внутрибрюшинное введение штамма Абсетаров (высоковирулентный при периферическом введении), развивалась кратковременная вирусемия (3–5 дней) и происходило размножение вируса в периферических органах (селезенка, печень). А. А. Пчелкиной с соавторами (1969) при экспериментальном заражении красной, рыжей и узкочерепной полевок удалось выявить инфекционный вирус на фоне развития противовирусного иммунитета. В. И. Ильенко с соавторами (1975) выделили вирус из мозга у обезьян *Macaca rhesus* вирус КЭ через 200 дней после заражения. У рыжих полевок с помощью метода флюоресцирующих антител антиген в мозге обнаруживали через 6–10 месяцев после лабораторного заражения (Окулова, 1986). У красных полевок удавалось активировать патогенный для белых мышей

вирус через 9 месяцев после заражения западносибирским штаммом (Бахвалова и др., 1996). Л. С. Субботиной с соавторами (1985) у белых мышей на фоне пассивной иммунизации был выделен ВКЭ в период 30 – 140 суток с момента инфицирования. Все вышеперечисленные экспериментальные данные подтверждают, что вирусоносительство у позвоночных резервуарных хозяев ВКЭ в природном очаге протекает в персистентной форме инфекции.

Следовательно, наибольшую роль в диссеминации вируса в природе играют восприимчивые животные с персистирующей инфекцией, поскольку эти животные не погибают, а являются разносчиками ВКЭ (Погодина и др., 1986).

Важным фактором, определяющим принадлежность того или иного вида позвоночных к группе основных участников круговорота вируса, является уровень численности и характер ее динамики. Для осуществления процесса циркуляции необходимо наличие животных, численность которых резко изменяется по годам и которые периодически пополняют очаг молодыми неиммунными особями. К таким животным относятся, прежде всего, мелкие лесные грызуны и насекомоядные, популяции которых ежегодно обновляются в результате короткой продолжительности жизни зверьков, так что к концу лета они почти целиком состоят из особей, родившихся в текущем сезоне (Формозов, 1947; Наумов и др., 1948; Морозов, 1964; Панов, 2001).

Пытаясь обнаружить взаимосвязь годовых колебаний грызунов и насекомоядных и частоты их контакта с вирусом, Ю. В. Морозов (1964), исследуя сыворотки крови грызунов в Пермской области, показал, что в период депрессии численности доля зверьков, содержащих в крови АГА АТ, была ниже, чем в период роста и пика численности: 10,1% и до 36%, соответственно. Л. А. Верета (1975), связывает подъем зараженности клещей и заболеваемости населения с подъемом численности мелких млекопитающих в предыдущем году.

Роль птиц, как и любого вида позвоночного животного в прокормлении иксодовых клещей зависит от его обилия, частоты контактов. Наиболее сильно птицы поражены таежным клещом в период депрессии численности мелких млекопитающих, когда запас активных голодных клещей, особенно нимф, велик

после предшествующего пика численности зверьков (Коренберг и др., 1964). В биотопическом плане наиболее велико значение клещей в сложных биоценозах: широколиственных низкогорных черневых лесах Алтае-Саянской горной страны, хвойно-широколиственных лесах Дальнего Востока (Таежный клещ..., 1985). Обилие птиц обычно не претерпевает столь резких колебаний численности как у мелких млекопитающих, в связи с чем годовые колебания численности клещей, прокормленных на птицах, главным образом зависят от запаса активных голодных клещей в природе. Еще более резкие различия в прокормлении птицами таежного клеща выявлены на уровне местообитаний. Так, в Калининградской области в южнотаежном лесу птицами были выкормлены 1–2% личинок и 1–3% нимф (Коренберг и др., 1964). На территории Западных Саян в сосново-березовом подтаежном лесу со стороны северных склонов птицы прокармливали 18% личинок и 27% нимф (Наумов, 1968). Более существенная роль птиц отмечена в прокормлении нимф таежного клеща: на территории Калининской области в сосняке птицы прокармливали 79 – 100% нимф (Гибет и др., 1965). В смешанном черневом лесу в долине ручья (Западные Саяны) птицы прокармливали 72% нимф (Наумов, 1968).

### 1.3. Генетические и фенотипические свойства ВКЭ, хозяин-зависимая изменчивость

#### 1.3.1. Строение ВКЭ

Возбудитель клещевого энцефалита – ВКЭ, как и все представители *Flaviviridae*, имеет сферическую форму диаметром до 50 – 60 нм. Обязательным компонентом вириона ВКЭ является липопротеиновая оболочка, формирующаяся из плазматической мембраны зараженной клетки. Внутри этой оболочки содержится капсид икосаэдрической формы, содержащий вирусную РНК. Геном *Flaviviridae* представлен одной молекулой РНК длиной около 11 000 нуклеотидов, которая содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую 3412 аминокислотных остатка полипротеина. Она обладает инфекционными свойствами (Wecker, 1959) и в бесклеточной системе ведет себя как мРНК.

Поэтому *Flaviviridae* отнесены к числу плюс-РНК-вирусов. На 5'-конце генома флавивирусов располагается кэп I типа (Rice et al., 1986; Liu et al., 2010). Ранее считалось, что РНК некоторых штаммов ВКЭ содержит полиА-тракт на 3'-конце (Mandl et al., 1988), но позже было показано, что данный фрагмент является внутренней частью варибельного участка их 3'-некодирующей области генома (Добрикова, Плетнев, 1995; Wallner et al., 1995). Варибельность 5'-нетранслируемого конца по данным некоторых исследователей может достигать 55%, и, предположительно, связана с адаптацией ВКЭ к репликации в клетках различных хозяев (Casati et al., 2006). В 5'-концевой части генома кодируются структурные белки вириона в порядке: С, ргМ (М) и Е, а в 3'-концевой три четверти генома занимают гены семи неструктурных белков: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5. При трансляции РНК этих вирусов синтезируется единый белок-предшественник, который подвергается процессингу на структурные и неструктурные белки (Castle, Wengler, 1987). Для сборки зрелого флавивируса синтезируется три вирусных структурных белка: капсидный С, мембранный М и поверхностный Е. Незрелый вирион содержит не белок М, а его предшественника – ргМ.

Белок С располагается с N-концевой части политрогеина ВКЭ и при сборке вируса совместно с геномной РНК образует центральную структурную компоненту нуклеокапсида. Обогащенный остатками основных аминокислот, данный белок, по-видимому, нейтрализует заряд на РНК при ее упаковке в нуклеокапсид и осуществляет связь геномной РНК с нуклеокапсидом.

Гликопротеин ргМ является предшественником белка М, его нет в составе зрелого вириона. В незрелых вирионах белок ргМ формирует гетерокомплекс с белком Е (Wengler, Wengler, 1989; Allison et al., 1995), устойчивый к действию детергентов. Наличие «якорного» участка гликопротеина Е стабилизирует гетерокомплекс. Совместный синтез гликопротеинов ргМ и Е требуется для правильного сворачивания, ассоциации с мембраной, пространственной ориентации и эффективной секреции белка Е Flaviviridae (Allison et al, 1995). Существует предположение, что одной из функций белка ргМ является защита белка Е от необратимых конформационных изменений, вызываемых созреванием в кислых визикулах во время транспорта гетерокомплекса через аппарат Гольджи, поскольку в кислых средах ргМ-содержащие вирионы устойчивее М-содержащих в 400 раз (Guirakhoo et al., 1992). При процессинге гликопротеина в составе вириона остается С-конец белка ргМ, являющийся белком М. Биологическая роль расщепления белка ргМ, по-видимому, состоит в том, что изменения, вызванные в оболочке вириона, обеспечивают инфекционность вируса (Randolph et al., 1990). Антитела к району 31 – 41 аминокислотных остатков белка М способны нейтрализовать инфекционность вируса, что свидетельствует о важной роли данного белка при проникновении вируса в клетку (Богачек и др., 2007).

Белок Е - наиболее важный поверхностный белок. Состоит из двух частей, различающихся по гидрофильно-гидрофобным свойствам. Согласно трехмерной модели димер растворимой формы белка Е имеет длину 170 Å. Каждый мономер, в свою очередь, состоит из трех доменов: I, II, III. Одной из важнейших функций белка Е является способность связываться с рецепторами клетки-мишени. Когда флавивирус попадает в клетку посредством рецептора эндоцитоза, для успешной

инициации вирусной репликации необходимы процессы, индуцирующие кислотозависимое слияние вирусной и эндосомальной мембран, в результате чего происходит высвобождение нуклеокапсида в цитоплазму клетки. Как описано для разных оболочечных вирусов, процессы слияния специфически контролируются гликопротеинами вирусной мембраны (White, 1990). Под действием усиливающейся кислотности происходит перестройка гомодимеров белка Е в тримеры, которые поднимаются на поверхность вириона и взаимодействуют с эндосомальной мембраной клетки-мишени (Helenius, 1995). Таким образом, белок Е по своим структурно-функциональным свойствам определяет не только тропизм вируса, но также играет ключевую роль в вирулентности вируса, развитии гуморального и клеточного иммунитета.

К неструктурным белкам относятся NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5, обеспечивающие репликацию вируса в клетке. В течение информационного цикла NS3 (спиральный) и NS5 (PHK-зависимый) белки образуют полимерные комплексы, которые, вероятно, связываются с мембранными через неструктурные протеины NS1 и NS2A. Белок NS1 связывается с мембранами как шестисторонние кольцеобразные частицы около 10 нм в диаметре, при денатурированном состоянии образуют стабильные димерные молекулы. NS1, ранее называемый «растворимый антиген», стимулирует протективный иммунный ответ против флавивирусов. Комплекс белка NS1 и гликопротеина Е отсутствуют в зараженных клетках и, несмотря на накопление индивидуальных составляющих его субъединиц, секретируются только в сыворотку крови (Морозова, 2001). Внеклеточная локализация комплекса на поздних стадиях инфекции исключает его участие в созревании вирионов и создает оптимальные условия для индукции синтеза вирусоспецифических антител. Эта форма белка известна как комплемент-связывающий растворимый антиген. Белок NS3 совместно с NS2B белком обеспечивают вирусоспецифическую протеазную активность для расщепления недавно синтезированных вирусных полипротеинов. Неструктурные белки NS4A и NS4B, возможно, дают соответствующую ориентацию полипротеинов в пределах внутриклеточных мембран, обеспечивая,

таким образом, правильное расщепление и функционирование полимеразных комплексов (Gritsun et al., 2003).

### **1.3.2. Географическое распространение и генетическое разнообразие ВКЭ**

На основании антигенных свойств, штаммы ВКЭ были разделены рядом исследователей на три основные генетические типы ВКЭ – дальневосточный (генотип 1, прототипный штамм Софьин), европейский (генотип 2, Найдорф) и сибирский (генотип 3, Заусаев, Васильченко) (Heinz et al., 1999; Злобин и др., 2001а; 2001б; 2003; Погодина и др., 2004а). Однако идентификация штаммов ВКЭ с помощью серологических методов из-за их тесных генетических взаимоотношений и близкого антигенного сходства является проблематичной (Демина и др., 2009). Выявлено существование фено-генетических различий как между генетическими типами (Погодина и др., 1992; Карань и др., 2006; Погодина и др., 2007; Герасимов и др., 2011а; 2011б; Погодина и др., 2012), так и внутри каждого типа вируса (Трухина, 1989; Леонова, 1997; Погодина и др., 2004б).

При изучении генетической вариабельности штаммов ВКЭ на основе анализа гомологии небольшого участка гена Е (160 н. о.) с помощью метода молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот (МГНК) предположено существование помимо трех основных генетических типов вируса (ДВ, Евр, Сиб), еще двух генетических типов: генотипа 4 – одиночный штамм 178-79 и генотипа 5 – группа вирусов, в состав которых входит штамм 886-84 (ранее казавшийся уникальным). Оба генетических типа содержали РНК политипных штаммов (Злобин и др., 2001а, б; Демина и др., 2009).

Развитие молекулярной эпидемиологии сформировало представление о географическом распространении ВКЭ. Так, генотип 1 (ДВ) доминирует на территории Дальнего Востока, Китая и в Японии на о. Хоккайдо, но также данный генотип регистрируется на территории Сибири и в странах Европы (Злобин и др., 2001а; Карань и др., 2007; Злобин, 2010) (рис.1.).

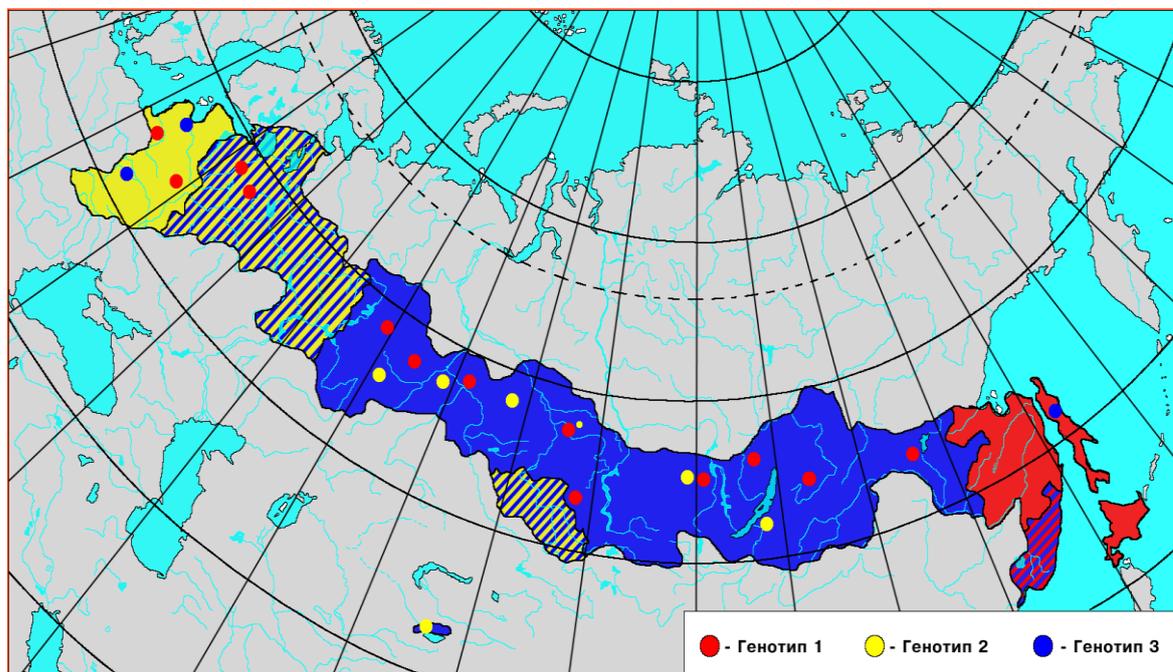


Рисунок.1. Географическое распространение генотипов ВКЭ (Злобин и др., 2007). Примечание: 1 – ДВ, 2 – Евр и 3 – Сиб.

Генетический тип 2 (Евр) распространен в основном на территории Центральной и Северной Европы (Германия, Австрия, Норвегия, Беларусь и т. д.), однако, как и в случае с ДВ генетическим типом, отдельные штаммы выявляются также и в Сибири (Леонова и др., 2012).

Генетический тип 3 (Сиб) в настоящее время - самый распространенный и занимает большую часть распространения ВКЭ, доминирует на Урале, в Сибири, Центральной Азии и Европейской части России. Отдельные штаммы Сиб генетического типа встречаются на территории, где доминирующими являются ДВ или Евр (Погодина и др., 2004а; Верховина и др., 2006; Злобин и др., 2007; Карань и др., 2007).

Таким образом, в пределах общей территории распространения доминирующего генетического типа вируса имеет место проникновение

остальных генетических типов ВКЭ, в связи с чем, ареалы существования генотипов перекрываются. Кроме того, замечено вытеснение одного генетического типа другим, например В. В. Погодина с соавторами (2007) на территории Свердловской и Кемеровской областей отмечает вытеснение дальневосточного генетического типа сибирским. Подобная экспансия на территории, где некогда доминировал ДВ генетический тип, отмечена Л. С. Карань с соавторами (2007). Так, при изучении штаммов, выделенных из мозга белых мышей после заражения суспензиями, приготовленными из *I. persulcatus*, установлена доминирующая циркуляция ВКЭ Сиб генетического типа на территории Западной и Восточной Сибири и в Центральном регионе России; на Урале выявлена смена доминирующего генетического типа: среди штаммов 40-х гг. 96% принадлежит ДВ генетическому типу, из 5 исследованных штаммов в 60-х гг. – 3 отнесены к ДВ и 2 к Сиб. В настоящее время установлено практически абсолютное доминирование (95% изолятов) в Свердловской области Сиб генетического типа ВКЭ (Ковалев и др., 2008). В Кемеровской области в 50-е гг. из 5 исследованных штаммов 2 принадлежат к ДВ, в 70-х гг. при исследовании 42 штаммов выявлены 3 штамма с одновременным присутствием Сиб и ДВ генетических типов. Только ДВ генетический тип был выявлен в одном штамме и в 38 штаммах выявлен только Сиб генетический тип ВКЭ. В настоящее время из клещей, собранных в Кемеровской области, детектируется только Сиб генетический тип. Подобная ситуация отмечена на территории Иркутска: в 60 – 70-х гг. в образцах клещей *I. persulcatus* абсолютно доминировал ДВ генетический тип, в 70 - 80х гг. доля Сиб генетического типа возрастает до 55,6%. В 2000-х Сиб генетический тип в образцах составляет уже 95,2% (Трухина, 2007).

Однако некоторые авторы полагают, что экспансию поддерживает ДВ генетический тип ВКЭ. Так, В. Б. Локтев (2007) считает, что изолирование в 1995 г. вируса КЭ от собаки в районе южной части острова Ошима и выделение в 1996 г. вируса из грызунов и клещей позволяет предположить формирование стойкого очага ВКЭ ДВ генетического типа (Takashima, 2001). Проведение филогенетического анализа японских изолятов и штаммов, выделенных в

Хабаровске, показал, что расхождение этих штаммов произошло 230 – 460 лет назад. Авторы высказывают гипотезу о том, что формирование японского очага ВКЭ произошло в результате заноса вируса перелетными птицами и проникновением инфицированных грызунов с морских судов. В результате исследования Е. В. Чаусовым (2009) штаммов, выделенных из клещей, обитающих на территории города Томска и его окрестностях, ставится под сомнение предположение В. И. Злобина (2007) о доминировании здесь Сиб генетического типа ВКЭ. Это объясняется выделением значительного количества вариантов ДВ генетического типа, который составил 47% в городских биотопах и 10,5% в пригородных. Е. И. Андаевым (2009), на основе генотипирования 61 штамма охарактеризована структура популяции вируса КЭ, циркулирующего в Приангарье и Забайкалье в 1995-2005 гг. Структура популяции сформирована на основе Сиб и ДВ генетических типов с абсолютным доминированием Сиб (87 %) в Приангарье (Иркутский район) и напротив, доминированием в Забайкалье ДВ (61,5%). Показано, что в очаге совместной циркуляции разных подтипов появляются смешанные штаммы вируса КЭ, в которых сочетаются генетические признаки сибирского и дальневосточного генетических типов; впервые в природном очаге в Приангарье изолированы четыре таких штамма, а в Забайкалье – один (Андаев, 2009).

Таким образом, при анализе хронологических рядов штаммов, выявленных почти за 50-летний период, показано изменение структуры вирусной популяции на территории Кемеровской, Свердловской, Иркутской и Томской областях. Ряд авторов приходят к выводу, что причинами смены генетических типов ВКЭ могут быть изменение экосистем в результате антропогенного влияния на очаговые территории, что обусловило трансформацию естественных ландшафтов, изменение видового состава прокормителей (как клещей, так и млекопитающих), включение в циркуляцию возбудителя иных видов клещей и все это на фоне изменения климата в сторону его смягчения и потепления (Цилинский, 1988; Вотяков и др., 2002; Андаев, 2009; Погодина и др., 2007).

Однако на территориях доминирования ДВ типа (Приморский край) из иксодовых клещей методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ–ПЦР) детектировали варианты Сиб типа ВКЭ (Андаев и др., 2012). На территории доминирования Сиб типа из проб головного мозга и селезенки мелких млекопитающих, а также из клещей посредством ОТ-ПЦР РВ выявляли ДВ и Евр варианты вируса (Bakhvalova et al., 2011) или только Евр (Kovalev et al., 2012). В зонах симпатрии генетических типов ВКЭ обнаружены смешанные штаммы, содержащие в своем геноме фрагменты генов белка Е и NS1 Сиб и ДВ, иногда Сиб и Евр генетических типов ВКЭ (Bakhvalova et al., 2011; Сидорова и др., 2012).

Полагают, что циркуляция минорных генетических типов на территории доминирования какого-либо основного генетического типа ВКЭ обусловлена эволюцией вируса, а появление в природной популяции вируса политипových вариантов обусловлено мутациями и рекомбинацией генетических вариантов вируса в организме одного и того же хозяина; частой сменой репродуктивной биологической системы. Высока вероятность смены генетических типов под действием антропогенных факторов окружающей среды. Это приводит к включению в процесс естественной циркуляции вируса селекции определенных вариантов ВКЭ (Погодина и др., 2007; Злобин, 2010; Погодина и др., 2012), а также феномена интерференции между экзогенным и эндогенным вариантами в организме позвоночных и беспозвоночных хозяев. Изучение генетической структуры Flaviviridae показало, что эволюционное развитие вирусов носит хозяин-зависимый характер.

В связи с изменением географического распространения генетических типов ВКЭ представляет интерес изучение хозяин–зависимых изменений в геноме вируса клещевого энцефалита.

### 1.3.3. Хозяин – зависимые изменения ВКЭ

Популяция ВКЭ, как и любого другого вируса, гетерогенна. Важной особенностью вирусов, переносимых членистоногими, является специфичность жизненного цикла, так как для успешного развития в клетках клещей или позвоночных должны существовать адаптивные процессы. Так, всего лишь несколько мутаций в генетическом типе, могут приводить к существенным изменениям свойств вируса, в том числе и к его способности к эффективной репродукции в определенном типе клеток (Карганова, 2013). В экспериментах отечественных и зарубежных ученых показано, что в организме клещей или лабораторных животных происходит селекция квазиспецифических субпопуляций ВКЭ, адаптированных к определенным хозяевам. В. Н. Ляпустин с соавторами (1987) производили эксперименты по пассированию ряда штаммов ВКЭ, в значительной мере изменивших свои характеристики при длительном пассировании в клещах. Клещей лабораторного поколения *Hyalomma anatolicum* заражали вирусом парентерально и содержали во влажных камерах 7 дней, затем гомогенизировали и вводили полученные суспензии рыжим полевкам *Myodes glareolus* и обыкновенным *Microtus arvalis* под кожу. Через 2 – 3 дня образцы крови и клещей титровали на НЛМ или культуре клеток почек эмбрионов свиньи (СПЭВ). Авторами было отмечено, что при пассировании на клещах штаммов с высокой периферической активностью и крупнобляшечным фенотипом, свойства штаммов кардинально менялись. Реверсия всех изученных характеристик у исследуемых штаммов происходила в организме полевок уже при 1-вом пассаже. Т. И. Дживанян с соавторами (1988) в процессе парентеральных пассажей на клещах *Hyalomma plumbeum* штамма ВКЭ, изолированного из клещей *I. persulcatus* - ЭК – 328 (выделен в Эстонии), ранее был получен вариант ВКЭ 718/574 Н. р<sub>17</sub>, который отличался от исходного по ряду признаков: имел мелкобляшечный фенотип в культуре клеток СПЭВ, резко сниженные гемагглютинирующие свойства, не синтезировал АГ, образующий в РИЭФ «катодный» преципитат, обладал пониженной патогенностью для белых мышей

при периферическом заражении. Таким образом, вариант ВКЭ, селекционированный адаптацией к клещам *H. plumbeum*, приобретал характеристики, свидетельствующие об изменении репродукции вируса в клетках млекопитающих. Вышеуказанные характеристики популяция вируса КЭ приобрела в результате длительного пассирования на клещах *H. plumbeum* (популяция вируса резко изменила свои свойства на уровне 13-го пассажа), причем приобретенные характеристики оставались стабильными на уровне 3-х пассажей на белых мышах. Дальнейшая переадаптация ВКЭ к клеткам млекопитающим сопровождалась изменениями ряда фенотипических свойств, однако вирус приобретал характеристики, отличающиеся от исходного штамма. На основании проведенного эксперимента авторы сделали заключение, что при длительном пассировании ВКЭ в исходных клещах формируется популяция с измененной способностью к репродукции в клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo*, обладающая потенциальными возможностями к усилению размножения вируса в клетках млекопитающих. По-видимому, именно способность быстрого изменения фенотипических свойств арбовирусов вследствие персистенции в клещах и сохранение генетической информации, необходимой для размножения в позвоночных, позволило приспособиться и развиваться вирусам в столь филогенетически различных типах хозяев, как членистоногие и позвоночные (Хазинская, Чунихин, 1988).

Применение современных молекулярно-биологических методов позволило Л. Ю. Романовой с соавторами (2004) обнаружить 2 аминокислотные замены в белке Е между исходными штаммами ЭК – 328 и адаптированным к клещам вариантом 718/574 Н. р1<sub>17</sub>, причем, только одна из них во 2-м домене в позиции 122 представлена на поверхности белка Е, тогда как другая лежит в районе стебля в позиции 426. В 2006 г. Л.Ю. Романова с соавторами изучала изменение антигенной структуры поверхностного белка Е ВКЭ при его адаптации к клещам и млекопитающим, используя наборы моноклональных АТ к разным антигенным доменам белка Е в ИФА и реакцию РИП вирусных белков, показала, что при адаптации ВКЭ к клещам наряду с описанными ранее изменениями

биологических и иммунохимических свойств, происходит изменение антигенной структуры вириона. Г. Г. Каргановой (2009) было установлено, «...что ВКЭ имеет два типа рецептора на поверхности клеток млекопитающих: высокоаффинный и низкоаффинный. Адаптация ВКЭ к клещам связана с появлением мутаций в белке E, повышающих аффинность связывания вирионов с гликозамингликанами на поверхности клетки, которые служат низкоаффинным рецептором для этого вируса...». Адаптация ВКЭ к клеткам хозяина сопровождается нуклетотидными заменами в 5' - НТО, в сигнальной последовательности белка рgM, в области белков E, NS2A, NS4A.

Таким образом, адаптации ВКЭ к клеткам членистоногих или млекопитающих происходит размножением присутствующих в популяции вируса мутантов, либо появлением мутантов, приспособленных к размножению в клетках данного вида (Карганова, 2013).

#### **1.4. Краткая физико-географическая характеристика Приобской лесостепи.**

Исследования проводили в антропургическом очаге клещевого энцефалита, расположенном в восточной части лесостепной зоны Западной Сибири на территории Приобской лесостепи в Новосибирской области.

Новосибирская область в основном расположена в пределах юго-восточной части Западно-Сибирской равнины, и только юго-восток ее захватывает небольшую долю Алтае-Саянской горной системы – Предсалаирье. Климат Новосибирской области обусловлен ее географическим положением внутри материка Евразии с соответствующим циркуляционным и радиационным режимом.

С севера территория области доступна воздействию арктических масс воздуха с его сухостью и низкими температурами. Открытость с юга способствует выносу прогретого континентального умеренного и даже тропического воздуха.

Наиболее интенсивно циркуляционные процессы развиты зимой, весной и в первой половине осени. Зимой климат обычно устойчив, так как территория находится под воздействием северной части азиатского антициклона. Весной уровень циклоничности увеличивается, происходит постепенное отступление и размывание отрога антициклона. Летом циклоническая деятельность спокойнее, чем в переходные сезоны. Активная циклоническая деятельность и большое число антициклональных образований, перемещающихся по территории области, обуславливают большую изменчивость погоды. Климат области континентальный, с резкими контрастами (Орлова, 1954; Кравцов, Донукалова, 1999).

Амплитуда средних месячных температур составляет  $36 - 40^{\circ}$ , а абсолютная амплитуда достигает  $95^{\circ}$ . Самый холодный месяц – январь, со средней многолетней температурой от  $-18,5$  до  $-20,5^{\circ}\text{C}$  с минимальными понижениями до  $-43 - 45^{\circ}$ . Средняя температура самого теплого месяца июля  $17,5 - 19,5^{\circ}$ . Ежегодно дневная температура может повышаться до  $20^{\circ}$ , а абсолютный максимум достигает  $40^{\circ}$ .

Сильно колеблется и годовое количество осадков, основное количество которых (75% годовой суммы) выпадает в теплый период, с апреля по октябрь, главным образом во второй половине лета.

Новосибирская область относится к умеренно теплому, недостаточно увлажненному агроклиматическому району.

По характеру растительности, территория области относится к трем зонам - лесной, лесостепной и степной. Северная часть области относится к подзоне южной тайги, точнее – к южной части подзоны, расширяющейся далеко на север, в пределы Томской области. Большую часть южной тайги занимают вторичные березовые массивы, возникшие на месте темнохвойных, исчезнувших в результате вырубок, пожаров. Для всей лесной зоны характерна региональная особенность таежной зоны Западно-Сибирской равнины – переувлажнение (Кравцов, Донукалова, 1999).

Так же хорошо выражена зона лиственных лесов, представляющая собой переходную полосу от лесостепи к собственно таежной. В ней встречаются признаки обеих. Деятельность человека в значительной мере оказала влияние на формирование типов растительности этой подзоны (Кравцов, Донукалова, 1999).

Растительный покров составляют осиново-березовые, березовые и осиновые травяные леса (из *Betula verrucosa*, *Populus tremula*) с разреженным древесным ярусом и мощным травяным покровом из лесных и лугово-лесных видов. В растительном покрове приобской лесостепи типичны простые сочетания обширных массивов агроценозов (на месте зональных злаково-разнотравных луговых степей, остепненных лугов) с осиново-березовыми колками в западинах и березовыми разреженными лесами по склонам. Степи плакоров сохранились лишь небольшими участками вблизи населенных пунктов. Флористический состав у них значительно изменен под антропогенным воздействием и отличается развитием устойчивых к вытаптыванию ксерофитных видов. Здесь формируются вторичные мелкодерновые злаково-полынные или осочково-тонконоговые степи. Узкие полосы разнотравных остепненных лугов окаймляют осиново-березовые колки (Кравцов, Донукалова, 1999).

### 1.5. Стационарный участок

Стационарный участок, на котором проводили полевые исследования, осуществляли сбор клещей и мелких млекопитающих для изучения в лаборатории, расположен на стыке подзон подтаежных лесов и северной лесостепи на правом берегу р. Оби, в 30 км к югу от г. Новосибирска в лесопарке Новосибирского научного центра (ННЦ). Площадь лесопарка составляет 90<sup>2</sup> км.

Растительность участка представлена березово-сосновыми лесами, являющимися частью ленточных приобских боров; к ним примыкают массивы осиново-березовых лесов. Участки леса чередуются с районами городской застройки ННЦ и сельскохозяйственными угодьями. Характерный элемент

ландшафта в лесопарке представляют лесо-луговые комплексы логов, балок, долин мелких рек (Шадрихи, Зырянки), где в основном сохранилась естественная растительность. Днища логов и балок большей частью заболочены и, в зависимости от степени увлажнения, покрыты кочковатыми березовыми лесами с ивовым подлеском, лесными крупнотравными лугами с ежой, тимофеевкой луговой, реже с канареечником (Пеньковская, 1963а, 1963б).

С учетом состава растительного мира, рельефа, увлажненности и степени рекреационной нагрузки на территории лесопарка ННЦ выделяют 5 основных типов местообитаний (Добротворский, 1992):

Первое местообитание – лога, овраги с ивняками и участками сосново-березовых и осиново-березовых лесов. Это достаточно увлажненные хорошо развитым высокотравьем расположенные примерно на 9% площади лесопарка.

Второе местообитание – выровненный рельеф с расположенными на нем березово-осиновыми лесами и березово-осиновыми колками. Травяной покров – разнотравье. Менее увлажненный биотоп, по сравнению с I местообитанием. Занимает более 50% территории стационарного участка. Данная территория имеет огромное рекреационное значение с интенсивным антропогенным воздействием.

Третье местообитание – относительная равнина из деревьев, преобладает сосна. Травяной покров сходен с местообитанием II. Влажность ниже, чем в местообитание II. Весьма значительное антропогенное воздействие.

К четвертому местообитанию отнесены сосновые леса с примесью осины, березы, акации. Травяной покров – разнотравье. Очень высокое антропогенное воздействие.

Пятое местообитание – сосновые леса.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Методы исследования

#### 2.1.1. Зоолого-паразитологические методы

**Учет численности и сбор имаго *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*.** Учеты численности и сбор половозрелых фаз иксодовых клещей для исследований проводили с растительности на флаг из белой вафельной ткани стандартного размера (60\*100 см) (Таежный клещ ..., 1985).

Учеты проводили на протяжении трех декад (со второй декады мая по первую декаду июня) с периодичностью один учет в десять дней на двух фиксированных, заранее измеренных маршрутах. Маршрут №1 протяженностью 1,6 км и №2 протяженностью 3,1 км. На двух дополнительных маршрутах периодичность составила - раз в двадцать дней (см. Рис. 2; Приложение 1). Относительный показатель численности (обилие клещей) выражали числом особей, собранных с флага на 1 км учетного маршрута (экз./флаго-км). Видовую принадлежность определяли с помощью стереоскопического микроскопа по морфологическим признакам (Филиппова, 1977).

Для расчета качественных критериев оценки численности пастбищных иксодовых клещей проведено ранжирование количественных рядов данных по обилию имаго иксодид с использованием градационной шкалы. Для расчета градационной шкалы использовали ряд многолетних архивных данных (1981–2006 гг.) и результатов собственных учетов (2006 – 2014 гг.). За основу шкалы брали типичные максимальные показатели обилия клещей. Резкие разовые отклонения от этих значений (превышающие их в 1,5 раза или более), трактовали как аномальные и при расчете шкалы не использовали. Градационную шкалу строили по принципу ограниченной сверху логарифмической шкалы (Песенко, 1982). Рассчитанная шкала приведена в таблице 1.

Градационная шкала расчета категорий численности пастбищных иксодовых клещей рекреационной зоны окрестностей г. Новосибирска

(Приобская провинция)

Баллы	Нижняя (экз./км)	Верхняя (экз./км)	Категория численности
1	0	2,2	Очень низкая
2	3,2	4,9	Низкая
3	5,9	10,7	Средняя
4	11,7	23,5	Высокая
5	24,5	52	Очень высокая
6	53 и более	Не определяется	Аномальная

**Учет численности и сбор преимагинальных фаз развития иксодовых клещей.** Сбор и учет численности преимагинальных фаз клещей проводили очесыванием мелких млекопитающих (грызунов и насекомоядных), отловленных в основном ловушко-линиями с использованием трапиковых ловушек-живоловок Шермана (Нецкий, 1972; Таежный клещ..., 1985; МУ 3.1.3012-12, 2011; Якименко и др., 2013). Животных, отловленных канавками, не очесывали.

**Учет численности и отлов мелких млекопитающих.** Отловы мелких грызунов и насекомоядных, определение вида, пола и возраста, осуществляли общепринятыми методами (Тупикова, 1964; Жмаева и др., 1964; Наумов, 1967; Карасева, Телицина, 1996; МУ 3.1.1029-01, 2001). Отлавливали животных круглогодично, но регулярно - с апреля по октябрь, – с использованием двух ловчих канавок с пятью цилиндрами (участки №1 и №2) длиной 50 м, шириной 20 см, глубиной 15 см. Дополнительно зверьков отлавливали ловушко-линиями с использованием ловушек Шермана, устанавливаемых по стандартной методике (Кучерук, Коренберг, 1964). Пойманных зверьков помещали в бязевые мешочки, плотно завязывали и доставляли в полевую лабораторию, где мешочки

осматривали, зверей очесывали мелким гребнем для снятия всех находящихся на шерстном покрове эктопаразитов по общепринятой методике и определяли видовую принадлежность, пол и генеративное состояние. В период 2006 – 2014 гг. обработано 16461 цилиндро-суток для учета численности зверьков и 48536 ловушко-суток для паразитологических исследований.

**Анализ участия мелких млекопитающих в прокормлении преимагинальных фаз иксодовых клещей.** Для оценки участия млекопитающих в прокормлении клещей применяли зоолого-паразитологические показатели (Беклемишев, 1961; Богданов, 1990; Бугмырин и др., 2009; Якименко и др., 2013):

1) индекс обилия (Ио, экз.) – среднее число неполовозрелых иксодид (личинок и/или, нимф) на одну особь очесанных зверьков (вида, отряда);

2) встречаемость (Ив, %) – доля особей с паразитами среди очесанных зверьков;

3) индекс прокормления (Ипп, экз.) – произведение Ио клещей и показателя относительной численности прокормителей (ос./100 л-с).

Работу с клещами и дикими млекопитающими проводили при соблюдении санитарно-эпидемиологических правил: СП 1.3.3118-13 «Безопасность по работе с микроорганизмами I – II групп патогенности»; СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней» в редакции постановления главного государственного санитарного врача РФ от 02.06.2009 № 42, от 29.06.2011 №86.

### **2.1.2. Вирусологические методы**

**Подготовка образцов для вирусологических и молекулярно-генетических исследований.** Имаго иксодовых клещей на спонтанную зараженность ВКЭ исследовали индивидуально. Клеща отмывали один раз в этиловом спирте 96%, два раза в физиологическом растворе (0,9%

NaCl), затем растирали в фарфоровой ступке и суспендировали в 0,2 мл физиологического раствора. Аликвоты суспензии до исследования хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Диких мелких млекопитающих перед вирусологическим исследованием очесывали и перед вскрытием проводили эвтаназию. Образцы органов (мозг и селезенка) извлекали с соблюдением условий стерильности. Образцы крови получали из ретробульбарного синуса до эвтаназии.

В исследование брали 10% суспензию органов, приготовленную на стерильном физиологическом растворе. В качестве отрицательного контроля использовали 10% суспензию органов интактных нелинейных белых мышей (НЛМ), для положительных контролей – гомогенатов органов НЛМ, зараженных штаммом ВКЭ. Суспензии разливали на аликвоты по 100-150 мкл и хранили до исследования при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Непосредственно перед исследованием пробы размораживали, центрифугировали 10 мин. при  $4^{\circ}\text{C}$  и 12000 об/мин.

Для молекулярно–генетических исследований в образцы суспензий клещей и органов мелких млекопитающих добавляли в соотношении 1:3 лизирующий раствор, содержащий гуанидин изотиоцианат. До исследования образцы хранили в замороженном состоянии при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

1. Полученные образцы исследовали методом биологической пробы на 6 – 7 г НБМ путем интрацеребрального или комплексного (интрацеребральное и подкожное) введения биологического образца по 0,03 мл и 0,03 мл + 0,25 мл, соответственно. Период наблюдения за зараженными НЛМ составлял 21 день.
2. Для выявления в крови вируснейтрализующих (ВН) антител к ВКЭ использовали метод биологической нейтрализации на 6 - 7 г НЛМ.

### 2.1.3. Иммунологические и серологические методы

1. Для детекции антигена Е ВКЭ в биологических образцах при проведении лабораторных экспериментов и первичного скрининга иксодовых клещей на спонтанную инфицированности ВКЭ применяли иммуноферментный метод (ИФА) с использованием тест-систем «ВектоВКЭ-антиген-стрип» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) согласно инструкции. Измерение оптической плотности проводили на планшетном фотометре «Мультискан» при длине волны 450 нм.
2. Для выявления гемагглютинирующего антигена ВКЭ применяли реакцию гемагглютинации (РГА) с использованием 0,4% взвеси эритроцитов гуся при pH = 6,2 – 6,3 (Clarke, Casals, 1958). Подтверждали видоспецифичность гемагглютинирующего антигена ВКЭ в реакции торможения гемагглютинации с типоспецифической сывороткой.
3. Для выявления наличия антигемагглютинирующих антител (АГА АТ) к ВКЭ в крови мелких млекопитающих и подтверждения видоспецифичности гемагглютинирующего антигена ВКЭ применяли реакцию торможения гемагглютинации (РТГА). У живых зверьков кровь собирали из ретроорбитального синуса на диски (в диаметре 1,5 см.) из обеззоленной фильтровальной бумаги, подсушивали и хранили при +4<sup>0</sup>С до исследования. Наличие АГА АТ к ВКЭ определяли в боратно-солевых элюатах дисков с последующей обработкой каолином и гусиными эритроцитами для удаления неспецифических гемагглютининов и устранения спонтанной агглютинации. Рабочее разведение диагностикума содержало 8 ГАЕ (Clarke., Casals, 1958).

#### 2.1.4. Молекулярно-генетические методы

Выделение суммарной РНК из биологических образцов проводили методом горячей фенол-хлороформной депротеинизации (Chomczynski, Sacchi, 1987). К 10% вирусодержащему образцу прибавляли лизирующий раствор, содержащий гуанидин изотиоцианат, в соотношении 1:3, перемешивали и нагревали в термошейкере TS-100 (Biosan, Латвия) 15 мин. при температуре 56<sup>0</sup>С. Далее к этой смеси приливали равное количество фенол-хлороформ-изоамиловой смеси (25:24:1) и вновь помещали в термошейкер на 7 мин. при температуре 56<sup>0</sup>С, интенсивность перемешивания 1200 об./мин. Затем образцы охлаждали при – 20<sup>0</sup>С в течение 10 мин. и центрифугировали 15 мин. при температуре +4<sup>0</sup>С 12000 об./мин (Eppendorf 5810R, Германия). Затем верхнюю водную фазу переносили в чистую пробирку и добавляли равное количество хлороформа. После встряхивания в течение 3 мин центрифугировали 15 мин. при температуре +4<sup>0</sup>С 12000 об./мин. Повторно в чистую пробирку отбирали верхнюю водную фазу и добавляли равное количество изопропанола, выдерживали 30 мин. при температуре +20<sup>0</sup>С и вновь центрифугировали 15 мин. при температуре +4<sup>0</sup>С. Сливали надосадочную жидкость, осадок суммарной РНК двукратно отмывали этанолом 70<sup>0</sup>; добавляли охлажденный ацетон и хранили при -70<sup>0</sup>С до дальнейшего исследования.

Выявление РНК ВКЭ в исследуемых образцах осуществляли в реакции обратной транскрипции (ОТ) с последующей двухраундовой полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с детекцией результатов в агарозном геле, и в ПЦР в режиме реального времени.

Для получения кДНК применяли обратную транскрипцию с использованием набора «РевертаL» согласно инструкции производителя («АмплиСенс», ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ) в амплификаторе с подогреваемой крышкой «БИС», Кольцово.

### ОТ- ПЦР с детекцией результатов в агарозном геле:

1. Выявление РНК ВКЭ. Двухраундовую полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием прямых и обратных праймеров к участкам гена Е ВКЭ (позиции 1089-1108, 2367-2386, 1182-1203 и 2216-2236 н.о. от начала генома ВКЭ штамма Софьин (JX498940)), сконструированных ранее в ИХБФМ СО РАН.

Олигону клеотид	Нуклеотидные последовательности праймеров	Позиции в геноме, н.о. (штамм Софьин (JX498940))
Праймеры для детекции ВКЭ		
Е3	5'- ТСААТggATgTgTggСТТgА -3'	1089 - 1108
Е4	5'- СТСАТgТТСАggСССААССА -3'	2367 - 2386
Е5	5' – gCggССАgАТgСССААСААТgg - 3'	1182 - 1203
Е6	5' – ТСССАggCgTgТТСТССТАТС - 3'	2216 - 2236

Реакцию амплификации проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1x буфер для ПЦР (5xбуфер для ПЦР – 0,335М Трис- НСl рН 8,9, 88мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween-20, 25% глицерин, 0,1% крезоловый красный), 200 мкМ дНТФ, 0,5 мкМ каждого праймера, 2 ед. акт. Таq-ДНК полимеразы и 3 мкл кДНК после ОТ (для постановки 1-го раунда ПЦР) или 1 мкл ампликона 1-ого раунда (для постановки 2-го раунда ПЦР). На поверхность смеси наслаивали минеральное масло. В качестве отрицательного контроля использовали бидистиллированную воду, в качестве положительного контроля – кДНК различных штаммов ВКЭ, либо ДНК-копию генов Е-NS1 ВКЭ штамма Софьин, клонированную в векторе pSVK3 ранее в ИХБФМ СО РАН.

Режимы ПЦР в амплификаторе с подогреваемой крышкой «БИС», Кольцово.

I раунд: олигонуклеотиды E3 и E4, температура крышки – 105<sup>0</sup>С.

Шаг I: 80<sup>0</sup>С – 3 мин; цикл – 1.

Шаг II: 94<sup>0</sup>С – 3 мин; 48<sup>0</sup>С – 0,5 мин; 72<sup>0</sup>С – 1,5 мин; цикл – 1.

Шаг III: 94<sup>0</sup>С – 0,5 мин; 48<sup>0</sup>С – 0,5 мин; 72<sup>0</sup>С – 1,5 мин; циклов – 45.

Праунд: олигонуклеотиды E5 и E6, температура крышки – 105<sup>0</sup>С.

Шаг I: 80<sup>0</sup>С – 3 мин; цикл – 1.

Шаг II: 94<sup>0</sup>С – 3 мин; 50<sup>0</sup>С – 0,5 мин; 72<sup>0</sup>С – 1,5 мин; цикл – 1.

Шаг III: 94<sup>0</sup>С – 0,5 мин; 50<sup>0</sup>С – 0,5 мин; 72<sup>0</sup>С – 1,5 мин; циклов – 45.

После ПЦР продукты реакции анализировали посредством электрофореза в 2 % агарозном геле, содержащем бромид этидия, с последующим облучением ультрафиолетовым светом в трансиллюминаторе ECX-20.L (VILBER-LOURMAT, Франция). При проведении ПЦР с использованием праймеров E3 и E4 образовывался фрагмент ДНК длиной 1298 п.н., с использованием праймеров E5 и E6 – длиной 1055 п.н.

**ОТ-ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ)** с индикацией результатов по конечной точке проводили с праймерами и зондами, соответствующими гену E, NS1 (Карань и др., 2007) с применением iCycler 4 (BioRad, США).

NS1: NS1F – (5'-YTTTCAGACAGGAACCAACAC-3'),

NS1R- (5'-CAGTTYCTCARGTCAGTGAC-3'),

NS1-зонд – (5'-FAM-CATGGCGGTCCACACTGACCAAA-BHQ1-3').

2. Определение и анализ нуклеотидных последовательностей ампликонов проводили в Центре секвенирования ДНК СО РАН с использованием набора Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) в соответствии с инструкциями производителя.

### 2.1.5. Статистический анализ

Для статистической обработки данных использовали редактор таблиц *Microsoft Excel for Windows*. Сравнение выборочных долей проводили по t-критерия Стьюдента (Лакин, 1980). Определение средних геометрических титров (СГТ) антител проводили вычислением антилогарифма от среднего арифметического десятичных логарифмов обратных значений титров в соответствии с указаниями (Ашмарин, Воробьев, 1962). Принят уровень значимости различий  $p < 0,05$ .

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 г. N 755).

## 2.2. Материалы исследования

### 2.2.1. Зоолого-паразитологические исследования

Часть данных для зоолого-паразитологических исследований были любезно предоставлены к.б.н., с.н.с. ИСиЭЖ СО РАН В. В. Пановым. Сбор клещей и мелких млекопитающих осуществляли на территории лесопарка ННЦ. Суммарная протяженность учетных маршрутов за изучаемый период (2006 – 2014 гг.) составила около 400 км (собрано 21054 экз. имаго пастбищных иксодовых клещей); видовая принадлежность определена для 4000 экз. иксодид.

Обработано 16461 цилиндро-суток для учета численности зверьков и 48536 ловушко-суток для паразитологических исследований. Вклад в прокормление преимаго иксодид оценивали по результатам анализа 2485 особей мелких млекопитающих, с которых методом очесывания было собрано 10095 экз. личинок и 1934 экз. нимфы.

Анализ участия в прокормлении проведен для мелких млекопитающих, относящихся к двум отрядам: грызуны Rodentia (11 видов) красная полевка *Myodes rutilus* Pallas, 1779 – 492 экз., полевая мышь *Apodemus agrarius* Pal., 1771 – 357 экз., полевка красно-серая *M. rufocanus* Sundervall, 1846 — 288 экз., лесная мышовка *Sicista betulina* Pal., 1779 – 138 экз., темная полевка *Microtus agrestis* L., 1761 – 148 экз., рыжая полевка *Myodes glareolus* Schreber, 1780 – 64 экз., мышь-малютка *Microtus minutes* Pal., 1771 – 57 экз., полевка обыкновенная *Microtus arvalis* Pal., 1778 – 133 экз., полевка-экономка *Microtus oeconomus* Pal., 1776 – 66 экз., мышь лесная азиатская *Ap. peninsulae* Thomas, 1907 – 59 экз., узкочерепная полевка *M. gregalus* Pal., 1779 – 71 экз. и насекомоядных Soricomorpha (4 вида) бурозубка обыкновенная *Sorex araneus*, L., 1758 – 438 экз., бурозубка средняя *S. caecutiens* Laxmann, 1788 – 93 экз., кутора обыкновенная – *Neomys fodiens* Pennant, 1771 – 31 экз., бурозубка малая *S. minutes* L., 1766 Названия отрядов приводятся по И. Я. Павлинову и А. А. Лисовскому (2012); видов насекомоядных по Б. С. Юдину (1989), грызунов по И. М. Громову и М. А. Ербаевой (1995).

### 2.2.2. Иммунологические и серологические исследования

**Клещи:** Методом ИФА на антиген Е ВКЭ исследовано 2660 экз. иксодовых клещей из них 1514 экз. - *I. pavlovskyi* и 1146 экз. - *I. persulcatus*. После интрацеребрального введения клещевых суспензий, на наличие антигена Е ВКЭ методами ИФА и РГА с подтверждением результата РГА в РТГА исследовали 917 образцов головного мозга нелинейных лабораторных мышей.

**Мелкие млекопитающие:** Для 138 ос. диких мелких млекопитающих, в том числе - красная полевка – 59 ос., полевая мышь – 79 ос., – проведена детекция антигена Е ВКЭ. После интрацеребрального или комплексного заражения НЛМ органами (головной мозг или селезенка) диких зверьков детекцию антигена Е ВКЭ провели в 112 особях лабораторных мышей.

Посредством РТГА определяли наличие вирусспецифичных АГА АТ в пробах крови красной полевки (195 ос.) и полевой мыши (246 ос.).

### 2.2.3. Вирусологические и молекулярно-генетические исследования

#### **Иксодовые клещи:**

Молекулярно-генетическими методами исследованы 1149 образцов клещевых суспензий. Методом биологической пробы на нелинейных лабораторных мышах исследовано 2050 индивидуальных клещевых суспензий.

Детекция и генотипирование РНК ВКЭ посредством двухраундовой ОТ-ПЦР или ПЦР в режиме реального времени (РВ) проведены для 57 образцов головного мозга НЛМ, положительных в ИФА и/или биологической пробе.

Для удобства интерпретации полученных данных, выделенные изоляты вируса КЭ условно разделили на биологические и изоляты РНК. Биологический изолят ВКЭ – выделенный из биологического объекта (НЛМ, 6 – 7 г) после интрацеребрального введения биологического образца (клещевая суспензия, головной мозг или селезенка диких млекопитающих, головной мозг биопробных НЛМ). Изолят РНК ВКЭ – выделенный методом полимеразной цепной реакции с предварительной обратной транскрипцией.

#### **Мелкие млекопитающие:**

Детекция РНК ВКЭ методом двухраундовой ОТ-ПЦР проведена для красной полевки – 59 ос. и полевой мыши – 79 ос. Детекцию и генотипирование РНК ВКЭ методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени провели у 21 ос. красной полевки и у 12 ос. полевой мыши.

Методом биологической пробы (комплексное заражение – введение клещевой или органной суспензии интрацеребрально и подкожно) на детенышах НЛМ трехдневного возраста была исследована зараженность патогенным ВКЭ 14 особей диких мелких млекопитающих и на детенышах 14-дневного возраста - 98 особей.

Молекулярное типирование РНК ВКЭ проведено для 64 особей НЛМ, зараженных суспензиями органов диких млекопитающих, независимо от наличия клинических признаков КЭ.

#### **2.2.4. Детекция ВКЭ и противовирусных антител в лабораторном эксперименте в процессе персистенции возбудителя в организме естественных хозяев**

Экспериментальное заражение диких млекопитающих проводили путем подкожного введения клещевой суспензии, составленной из проанализированных комплексом вышеперечисленных методов индивидуальных суспензий иксодид объединением в пул нескольких положительных суспензий. Перед введением диким зверькам суспензии в ней определяли количество инфекционного вируса КЭ путем интрацеребрального (0,03 мл) и подкожного (0,25 мл) заражения 6 – 7 г НЛМ. Титр вируса исчисляли по методу Рида и Менча (Reed, Meunch, 1938) и выражали в  $lgLD_{50}$ .

Красных полевок ( $n = 36$ ) и полевых мышей ( $n = 30$ ) отлавливали на стационарном участке в конце августа – начале сентября. До экспериментального исследования животных содержали в индивидуальных клетках. Через 30 суток лабораторного содержания у животных прижизненно брали кровь из ретроорбитального синуса для исследования на наличие ВН и АГА АТ.

Через 2, 4, 8, 16, 30, 60, 90 и 120 суток после подкожного заражения у диких мелких млекопитающих получали образцы крови в динамике до эвтаназии и исследовали на наличие ВН и АГА АТ, а также для детекции и генотипирования РНК ВКЭ. При финальном сборе крови после эвтаназии из головного мозга и селезенки готовили 10% суспензию для вирусологических, иммунологических, серологических и молекулярно-генетических исследований. Биопроба и детекция антигена Е ВКЭ была проведена для 66 особей НЛМ, зараженных интрацеребрально суспензиями органов диких зверьков.

Генотипирование РНК ВКЭ посредством ОТ–ПЦР РВ была проведена до (красная полевка – 36 образцов крови; полевая мышь – 30 образцов крови) и после заражения клещевой суспензией в образцах крови животных (красная полевка ; головной мозг и селезенку исследовали после заражения у 36 особей красной полевки и 30 особей полевой мыши, а также 66 особей НЛМ.

### 2.3. Природно-географическая характеристика территории исследования

Неоднородность территории лесопарка ННЦ в рельефе обуславливает различия в почвенно-растительном покрове, которые в свою очередь влияют на гигротермические условия припочвенного слоя.

*Участок №1.* Сосновый бор со слабой увлажненностью. Подлесок очень скудный, в основном состоит из караганы древовидной, травостой – разнотравье, папоротник-орляк, злаки, гумусовая подушка практически не образуется. В летний период достаточно часто посещается людьми.

*Участок №2.* Расположен на территории Центрального ботанического сада (ЦСБС). В древостое преобладает береза с некоторой примесью осины, располагается на относительно выровненной поверхности с хорошо развитым травостоем и слабой увлажненностью (незначительная часть маршрута проходит вблизи искусственного водоема – Лаврентьевского пруда). Значительно разреженный древостой создает благоприятные условия для проникновения большого количества солнечного света, что способствует значительному прогреву опавшей листвы. Валежник и опавшие листья убираются только на центральных дорожках, территория часто посещается людьми для прогулок, пикников и выгула собак.

*Участок № 3.* Редко посещаемый людьми березово-осиновый древостой с вкраплениями сосны и хорошо развитым травостоем. Располагается частично в ложбине, проходит недалеко от лесного озера, что обеспечивает благоприятную для клещей увлажненность. Даже в летние жаркие дни высокий травостой создает повышенную влажность и пониженную температуру воздуха.

*Участок №4.* Пойма мелкой речки Шадрихи. Разреженный сосновый бор с примесью березы, осины, а также высокая увлажненность способствуют развитию хорошего мелколиственного подлеска, который, в свою очередь, образует хорошо развитый гумусовый слой.



Рисунок 2. Участки сбора имаго пастбищных иксодовых клещей и отлова мелких млекопитающих. Участки №1,2 – регулярный сбор клещей и отлов мелких млекопитающих; №3,4 – дополнительные участки сбора клещей.

### Глава 3. ЧИСЛЕННОСТЬ И ВИРУСОФОРНОСТЬ ВКЭ *IXODES PERSULCATUS* И *IXODES PAVLOVSKYI* В АНТРОПУРГИЧЕСКОМ ОЧАГЕ

#### 3.1. Многолетняя динамика численности сообщества иксодид

На территории лесопарка Новосибирского научного центра обычно наблюдался относительно низкий уровень численности иксодовых клещей, что объясняется отсутствием оптимальных условий для их развития – при достаточной теплообеспеченности лимитирует дефицит влаги (Добротворский и др., 1994). Однако в последние годы отмечен повсеместный значительный рост количества иксодовых клещей на территории Евразии, включая Новосибирскую, Иркутскую области, Красноярский край и др.

Многолетний мониторинг паразитарной системы КЭ на территории и в окрестностях Академгородка на протяжении 30 лет проводился на двух регулярных маршрутах – участок №1 и участок №2. С 2006 г. для изучения численности и видового состава иксодовых клещей введены еще два маршрута – №3 и №4, различные по геоботаническим параметрам. Учет осуществляли ежедекадно со второй декады мая по первую декаду июня включительно. Карта-схема маршрутов и участков сбора клещей представлена на Рисунке 2 в главе «Материалы и методы».

Следует отметить, что в весенне-летних сборах клещей помимо двух массовых видов пастбищных иксодид встречались единичные экземпляры *Dermacentor reticulatus* Fabr., 1894, доля которых не превышала 1,0 - 2,0%. В связи с незначительностью вида в сборах иксодовых клещей данный вид клеща в дальнейшем в нашей работе не исследовался.

В целом, по изучаемой территории с начала проведения учетов и по 2005 г. включительно, среднесезонная численность имаго иксодовых клещей составила 11,5 экз./флаго-км (лимиты 4,4 – 18,6 экз./флаго-км). Однако с 2005г. отмечено увеличение численности клещей. По усредненным данным за 2006 – 2014гг. среднесезонная численность составила 41,9 экз./флаго-км (лимиты 21,8 – 61,1 экз./флаго-км) (Рисунок 3).

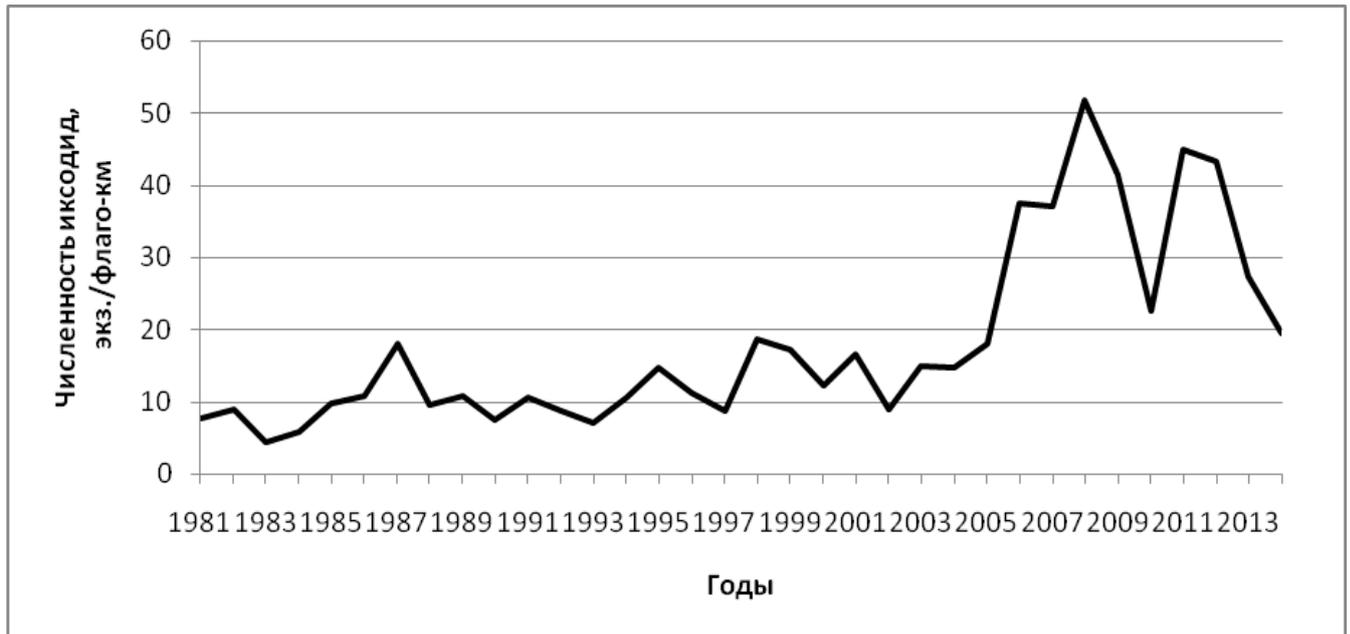


Рисунок 3. Многолетняя среднесезонная динамика численности пастбищных иксодовых клещей на территории лесопарка ННЦ.

На основании полученных данных, проанализированных с использованием градационной шкалы (см. главу 2, стр. 45) выявили, что численность пастбищных иксодовых клещей на территории лесопарка ННЦ в 1981 – 2005 гг. варьировала от средней до высокой, а с 2005 г. увеличивается от высокой до очень высокой.

Известно, что в северной части лесостепи правобережного Приобья, в том числе и в лесопарке ННЦ, абсолютно доминирует таёжный клещ *I. persulcatus* (Сапегина и др., 1985; Добротворский и др., 1994). В последние годы (ориентировочно с 2005 – 2006 гг.) в городских и пригородных биотопах г. Новосибирска (Чичерина и др., 2011; Ливанова и др., 2011; Якименко и др., 2013; Бахвалова и др., 2015) отмечена экспансия пастбищного иксодового клеща из группы *persulcatus* – клеща Павловского *I. pavlovskyi*, ранее регистрируемого здесь в единичных экземплярах (Богданов, 2006). Это соответствует резкому всплеску суммарной численности иксодид (см. рис. 3), что дает основание говорить о существенном вкладе в суммарную численность переносчиков на исследуемой территории клеща *I. pavlovskyi*.

### 3.1.1. Показатели численности и биотопические особенности распределения пастбищных иксодид на территории ННЦ

Для двух массовых видов пастбищных иксодовых клещей - *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* нами была исследована среднесезонная численность в зависимости от геоботанических условий места сбора (описание участков сбора детально описано в главе 2 «Материалы и методы» стр. 56).

Среднесезонная суммарная численность клещей в сосновом ленточном бору (уч. №1) составила  $24,4 \pm 0,5$  экз./флаго-км. Численность *I. pavlovskyi* составила  $16,9 \pm 0,6$  экз./флаго-км, *I. persulcatus*  $2,0 \pm 0,2$  экз./флаго-км (Таблица 2).

В разреженном мелколиственном березовом лесу с примесью осины численность клещей по усредненным данным составила  $59,2 \pm 0,6$  экз./флаго-км. Численность *I. pavlovskyi* в среднем составила  $52,1 \pm 0,8$  экз./флаго-км, *I. persulcatus*  $4,2 \pm 0,2$  экз./флаго-км (Таблица 2).

На участке № 3, в мелколиственном березово-осиновом лесу, численность иксодид составила  $33,8 \pm 0,6$  экз./флаго-км. При этом, численность *I. pavlovskyi* была на уровне  $26,5 \pm 0,8$  экз./флаго-км, *I. persulcatus*  $7,0 \pm 0,4$  экз./флаго-км (Таблица 2).

Численность клещей на контрольном участке №4, расположенном в сосновом бору с примесью березы и осины, по усредненным данным составила  $36,8 \pm 0,8$  экз./флаго-км: численность *I. pavlovskyi* в среднем составила  $7,8 \pm 0,4$  экз./флаго-км, *I. persulcatus*  $11,9 \pm 0,5$  экз./флаго-км (Таблица 2).

Среднесезонная численность *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* на территории лесопарка Академгородка (2006 – 2014 гг.)

Участки сбора	Среднесезонная, $\frac{1}{\text{экз./флаго-км} \pm s_x}$ Лимиты среднесезонной (min–max)	<i>I. pavlovskyi</i> , экз./флаго-км	<i>I. persulcatus</i> , экз./флаго-км
№1 - от ННЦ до 3км. Сосновый ленточный бор.	$\frac{24,4 \pm 0,5^{b,c}}{8,3-41,0}$	$\frac{16,9 \pm 0,6^*}{89,4 \pm 1,0^\dagger}$	$\frac{2,0 \pm 0,2^*}{10,6 \pm 1,0^\dagger}$
№2 - от ННЦ до 3км. Разреженный мелколиственный осиново-березовый	$\frac{59,2 \pm 0,6^{a,d}}{31,3-98,9}$	$\frac{52,1 \pm 0,8^*}{91,6 \pm 0,7^\dagger}$	$\frac{4,8 \pm 0,2^*}{8,4 \pm 0,7^\dagger}$
№3 - от ННЦ до 6км. Мелколиственный березово-осиновый лес.	$\frac{33,8 \pm 0,6^{b,d}}{11,6-54,3}$	$\frac{26,5 \pm 0,8^*}{79,1 \pm 1,2^\dagger}$	$\frac{7,0 \pm 0,4^*}{20,9 \pm 1,2^\dagger}$
№4 – от ННЦ до 15км. Сосновый бор с примесью березы, осины.	$\frac{36,8 \pm 0,8^{b,d}}{12,0-55,0}$	$\frac{7,8 \pm 0,4^*}{20,0 \pm 1,2^\dagger}$	$\frac{31,3 \pm 1,0^*}{80,0 \pm 1,2^\dagger}$
Всего по территории лесопарка	$\frac{41,9 \pm 0,3}{8,3-98,9}$	$\frac{28,7 \pm 0,8}{70,8 \pm 0,7}$	$\frac{11,9 \pm 0,5}{29,2 \pm 0,7}$

Примечание: <sup>1</sup> - экземпляров клещей на 1 км, собранных за 2-ю, 3-ю декаду мая и 1-ю декаду июня  $\pm s_x$ ; достоверные отличия ( $p < 0,001$ ): a – b, c-d, \* - внутривидовые по участкам сбора; † - межвидовые по участкам сбора.

Из всех обследованных групп местообитаний в наибольшем числе ( $p < 0,001$ ) клещи встречались в осиново-березовом лесу, менее высокая численность клещей отмечена в березово-осиновом лесу, минимальная - в сосновом ленточном бору. По усредненным показателям с трех ключевых участков, различающихся геоботаническими условиями, в целом территория лесопарка ННЦ по нашей градационной шкале относится к категории территорий с высокой численности пастбищных иксодовых клещей. При этом для *I. persulcatus* характерен средний уровень численности, тогда как для *I. pavlovskyi* – высокий или очень высокий. На территории рекреационной зоны г. Новосибирска - лесопарка ННЦ во всех растительных формациях устойчивое доминирующее положение занимает *I. pavlovskyi* (рис. 4). Однако, на контрольном участке (№4) в сосновом бору с примесью березы и осины, как и на всей территории Новосибирской области,

доминирующим видом остается *I. persulcatus*. Рост численности *I. pavlovskyi* может быть обусловлен более коротким циклом полного метаморфоза (1 - 2 года), тогда как полный цикл развития у *I. persulcatus* на изучаемой территории составляет 3 - 4 года (Сапегина, 1985; Добротворский, 1992).

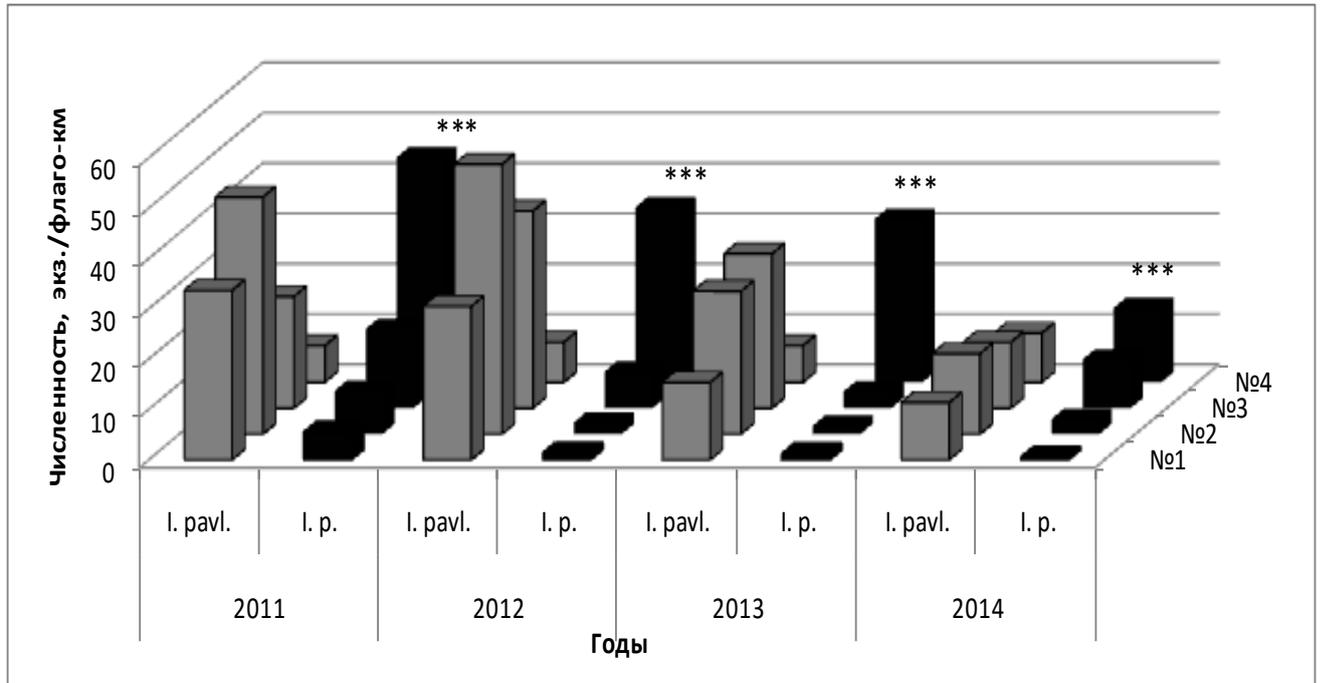


Рисунок 4. Динамика численности и соотношение долей (%) в сообществе иксодид *I. persulcatus* (*I.p.*) и *I. pavlovskyi*(*I.pavl.*) в лесопарке ННЦ (2011 – 2014 гг.) \*\*\* – ( $p < 0,001$ ) преобладание в сборах *I. persulcatus* (*I.p.*) на уч.№4 в отличие от уч.№1, №2 и №3

В целом на изучаемой территории *I. pavlovskyi* из некогда малочисленного вида становится содоминирующим, составляя от  $60,6 \pm 1,5\%$  до  $82,5 \pm 0,9\%$  в сборах иксодид. Абсолютно доминирует на участках №1, №2, №3, а доминирование *I. persulcatus* остается только на участке №4 (см. рис. 4).

Изучение динамики численности доминирующих видов пастбищных иксодовых клещей позволяет исследовать произошедший в последнее десятилетие рост численности иксодид. Изучение архивных и собственных данных по численности иксодовых клещей на территории лесопарка ННЦ показывает, что основную массу клещей на двух регулярных маршрутах составляют *I. pavlovskyi*, численность которых по усредненным данным в 2011 – 2014 гг. была  $29,6 \pm 0,4$

экз./флаго-км (лимиты 13,7 – 42,1 экз./флаго-км). Численность *I. persulcatus* составила  $5,4 \pm 0,1$  экз./флаго-км (лимиты 1,5 – 7,1 экз./флаго-км).

Таблица 3

Численность доминирующих видов иксодид на территории лесопарка ННЦ,  
экз./флаго-км (2011–2014гг.)

Вид клеща	Годы			
	2011	2012	2013	2014
<i>I. pavlovskyi</i>	40,4±0,5	42,1±0,5	21,9±0,4	13,7±0,4
<i>I. persulcatus</i>	7,1±0,1	1,9±0,1	1,5±0,1	1,8±0,1

Таким образом, резкое увеличение численности пастбищных иксодовых клещей, произошедшее на территории лесопарка ННЦ, связано со значительным ростом численности *I. pavlovskyi*, тогда как уровень численности *I. persulcatus* сопоставим с уровнем численности клещей в 1981 – 2005 гг.

### 3.2. Вирусофорность пастбищных иксодовых клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*

Подготовленные индивидуальные пробы иксодовых клещей исследовали на содержание антигена Е ВКЭ (ИФА), РНК ВКЭ (ОТ–ПЦР РВ) и патогенного для НЛМ вируса КЭ (метод биологической пробы).

Антиген Е ВКЭ в пробах *I. pavlovskyi* методом ИФА детектировали в  $1,6 \pm 0,3\%$  проб, а у *I. persulcatus* в  $0,8 \pm 0,2\%$  проб. Методом биологической пробы на НЛМ у *I. pavlovskyi* выделено  $2,6 \pm 0,4\%$  биологических изолятов ВКЭ. Из проб *I. persulcatus* соответствующим методом выделили  $1,1 \pm 0,3\%$  биологических изолятов ВКЭ. В пробах клещей РНК ВКЭ детектировали двумя вариантами ОТ–ПЦР. Так, РНК ВКЭ в пробах *I. pavlovskyi* детектировали в  $6,6 \pm 1,2\%$ , а у *I. persulcatus* в  $4,9 \pm 0,9\%$ .

Исследование проб клещей комплексом вирусологических и молекулярных методов позволило выявить разные сочетания детекции антигена Е, РНК ВКЭ и патогенного вируса КЭ (Таблица 4). Из 35 образцов клещей *I. pavlovskyi*, в которых было показано присутствие антигена и РНК ВКЭ, 28 при интрацеребральном заражении НЛМ вызвали у животных манифестную инфекцию уже при первичном заражении. При последующем исследовании органов пассажных животных (после первичного заражения) у 18 из них детектировались антиген Е и РНК ВКЭ, в одном – только РНК ВКЭ, в девяти – только антиген Е ВКЭ. У остальных семи образцов при интрацеребральном заражении НЛМ клинической картины заболевания у пассажных животных не наблюдали, при дальнейшем исследовании органов пассажных животных индицировали присутствие РНК ВКЭ при отсутствии индикации специфического антигена в ИФА. Однако, при дальнейшем пассировании данных биологических изолятов через мозг НЛМ, во всех 35 случаях удалось индицировать РНК ВКЭ в органах пассажных животных. Из 28 образцов клещей *I. persulcatus*, в которых разными методами показано присутствие ВКЭ, методом биологической пробы выделили девять изолятов ВКЭ, в семи из которых были индицированы антиген Е

и РНК ВКЭ, в двух – только антиген Е ВКЭ. У остальных 19 образцов при интрацеребральном заражении НЛМ клинической картины заболевания у пассажных животных не наблюдали, при дальнейшем исследовании органов пассажных животных индицировали присутствие только РНК ВКЭ.

Таблица 4

Отличия частот детекции ( $\% \pm m^1$ ) субвирионных компонентов (белка Е и РНК ВКЭ) и патогенного вируса КЭ в иксодовых клещах (2011– 2014 гг.)

Вид клеща	Частота детекции ВКЭ		
	Белка Е ВКЭ	Патогенного для НЛМ вируса КЭ	РНК ВКЭ
<i>I. pavlovskyi</i> (n=35 <sup>2</sup> )	51,4 ± 8,6 <sup>a</sup>		
	25,7 ± 7,5		–
	–	–	20,0 ± 6,9 <sup>b</sup>
	2,9 ± 2,9	–	2,9 ± 2,9
<i>I. persulcatus</i> (n=28)	25,0 ± 8,3		
	7,1 ± 4,9		–
	–	–	67,9 ± 9,0

Примечание: <sup>1</sup>m–статистическая погрешность процента; <sup>2</sup>–количество положительных образцов; <sup>a</sup>– ( $p < 0,05$ ) отличия варианта детекции белка Е, РНК ВКЭ и б/п положительные у *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*; <sup>b</sup> – ( $p < 0,001$ ) отличия детекции РНК ВКЭ у *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*

Таким образом, в клещах *I. pavlovskyi* достоверно чаще детектировали антиген Е, РНК ВКЭ и выявляли в биопробе патогенный вирус, чем в клещах *I. persulcatus*, в которых наиболее часто индицировали только РНК ВКЭ. Вероятно, это связано с гетерогенностью фено-генотипических свойств популяции ВКЭ, в связи с чем использование только одного какого-либо метода не позволяет

адекватно оценить масштаб инфицированности резервуарных хозяев вируса. Молекулярно-биологические методы позволяют определять апатогенные формы вируса, не вызывающие клинических симптомов КЭ у НБМ, но не всегда детектируют единичные вирионы, регистрируемые методом биопробы на мышах. Это может быть обусловлено как генетической изменчивостью вируса и нестабильностью РНК при выделении и хранении, так и недостаточной эффективностью обратной транскрипции ОТ (20 - 80%) (Морозова и др., 2014).

### **3.3. Молекулярное типирование ВКЭ в клещевых суспензиях и органах пассажных НЛМ**

#### **3.3.1. В случаях с клинической картиной заболевания**

После первичного скрининга в ИФА 1178 экз. *I. persulcatus* и 1655 экз. *I. pavlovskyi* положительными образцами проведено интрацеребральное заражение НЛМ (см. раздел 3.2). Исходные суспензии клещей, вызвавших манифестную инфекцию у НЛМ, исследовали в ОТ–ПЦР РВ с целью генотипирования ВКЭ. В результате в 20 образцах *I. pavlovskyi* типировали два генотипа РНК ВКЭ в виде смешанной инфекции – Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ и Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ + Евр-ВКЭ; в 3 образцах в виде моноинфекции – Сиб-ВКЭ – 1 изолят, ДВ-ВКЭ – 2 изолята. В восьми образцах *I. persulcatus* выявлены два генетических типа РНК – Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ и Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ + Евр-ВКЭ в виде смешанной инфекции (Таблица 5).

При исследовании органов пассажных животных с выраженными клиническими признаками заболевания после заражения суспензиями *I. pavlovskyi* (n = 23) показана смешанная инфекция в виде двух генотипов Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ во всех образцах. Также в виде смешанной инфекции Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ выявлялся ВКЭ в восьми биологических изолятах от *I. persulcatus*.

Таким образом, в клещевых суспензиях, вызывавших заболевание НЛМ при заражении, ВКЭ достоверно чаще был представлен в виде смешанной

инфекции Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ. При исследовании этих образцов в биопrobe на НЛМ, в органах пассажных животных ВКЭ был представлен только в смешанном варианте Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ.

Таблица 5

Частоты и варианты выявляемости генетических типов РНК ВКЭ в клещевых суспензиях, патогенных для лабораторных животных (только положительные образцы)

Вид клеща	Формы инфекции			
	Моноинфекция			Смешанная инфекция
	<u>Генетические типы ВКЭ</u>			
	Частоты выявляемости РНК, %±m <sup>1</sup>			
	ДВ-ВКЭ	Сиб-ВКЭ	Евр-ВКЭ	ДВ-ВКЭ+Сиб-ВКЭ; Евр-ВКЭ+Сиб-ВКЭ
<i>I. pavlovskyi</i> (n = 23) <sup>2</sup>	13,0±7,2			87,0±7,2 <sup>a</sup>
<i>I. persulcatus</i> (n = 8)	0			100 <sup>a</sup>

Примечание: <sup>1</sup> -% особей, содержащих РНК ВКЭ; m - статистическая ошибка, %; <sup>2</sup> - количество положительных образцов; <sup>a</sup>(p < 0,001) отличия частот детекции смешанной и моноинфекции у *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*

### 3.3.2. В случаях с отсутствием клинической картины

Как показано в разделе 3.2 главы 3, в ряде случаев при заражении НЛМ суспензиями клещей, в которых методом ИФА индицировали присутствие специфического антигена, клинической картины заболевания у пассажных животных не наблюдали. Исходные суспензии клещей, при заражении которыми

у НЛМ клиническая картина заболевания отсутствовала, были исследованы с целью генотипирования возбудителя в ОТ-ПЦР РВ.

У *I. pavlovskyi* частота детекции РНК ВКЭ составила  $2,0 \pm 0,7\%$ , возбудитель был представлен в виде моно- (восемь РНК-изолятов) – и смешанной (два РНК-изолята) форме, соответственно – в четырех образцах – Сиб-ВКЭ; по одному – ДВ-ВКЭ и Евр-ВКЭ, в двух – Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ и Сиб-ВКЭ + Евр-ВКЭ.

У *I. persulcatus* частота детекции РНК ВКЭ составила  $4,3 \pm 0,8\%$ , возбудитель был представлен в виде моно- (19 РНК-изолятов) – и смешанной (три РНК-изолята) форме, соответственно - в двух образцах – ДВ-ВКЭ, в трех – Евр-ВКЭ, в 14 – Сиб-ВКЭ, в трех – Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ.

У обоих видов клещей РНК-изоляты ВКЭ были представлены преимущественно возбудителем Сиб генетического типа.

При выборочном исследовании органов НЛМ ( $n = 6$ ), заражение которых суспензиями положительных в ИФА клещей не сопровождалось развитием заболевания, РНК ВКЭ двух генотипов (Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ) была выявлена в четырех образцах.

Таким образом, несмотря на абсолютное преобладание в выявляемых молекулярными методами исследования возбудителя КЭ в клещах в виде монотипа, в органах пассажных животных выявляются смешанные варианты возбудителя на фоне отсутствия клинических проявлений инфекционного процесса. При этом минорные последовательности, по-видимому, могут получать преимущество при репликации в организме восприимчивых животных (в нашем случае – НЛМ), и достигать концентраций, достаточных для выявления методами молекулярно-генетического анализа.

На территории лесопарка ННЦ с 2006 г. отмечен рост численности пастбищных иксодовых клещей. Это связано с увеличением численности вида *I. pavlovskyi*, при том что численность *I. persulcatus* сопоставима с таковым показателем за 1980 – 2000 гг. Изучение пространственного распределения

иксодид показало, что *I. pavlovskyi* занимает доминирующее положение в структуре сообщества клещей на территории ННЦ, при том, что за его пределами ситуация не изменилась: доминирующее положение *I. persulcatus* сохраняется почти во всех пригодных для его жизнедеятельности биотопах на всей территории Западной Сибири (Романенко, 2007; 2009а; Якименко и др., 2013).

В клещах *I. pavlovskyi* достоверно чаще, чем в клещах *I. persulcatus*, детектировали антиген Е, РНК ВКЭ и выявляли в биопrobe патогенный вирус. У *I. persulcatus* наиболее часто индицировали РНК ВКЭ.

Возбудитель КЭ в клещах был представлен тремя генотипами с преобладанием Сиб-ВКЭ. Все три генотипа в клещах были представлены как в виде моноварианта, так и в виде смешанных вариантов, с преобладанием моновариантов. При исследовании суспензий клещей в биопrobe на НЛМ, в органах пассажных животных индицировали только смешанные варианты ВКЭ (Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ). При этом выявление в исходных суспензиях клещей минорных последовательностей не всегда успешно, на что указывают последующие исследования их в биопrobe и индикация возбудителя в органах пассажных животных.

## **Глава 4. МЕЛКИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИЕ – ПРОКОРМИТЕЛИ КЛЕЩЕЙ И ЕСТЕСТВЕННЫЕ ХОЗЯЕВА ВКЭ**

Видовое разнообразие мелких млекопитающих predetermined сочетанием экологических особенностей различных биотопов на территории лесостепи Западной Сибири. Здесь встречаются лесные виды – красная полевка и азиатская лесная мышь – характерные для тайги; типичные представители мелколиственных лесов – рыжая полевка и лесная мышовка. Наряду с типично лесными видами распространены виды открытых пространств – обыкновенная полевка, узкочерепная полевка. Встречаются виды, приуроченные к местам повышенной влажности – полевка-экономка.

### **4.1. Численность сообщества мелких млекопитающих**

Сообщество позвоночных резервуарных хозяев ВКЭ и прокормителей клещей включает представителей нескольких классов – млекопитающих, птиц, рептилий и амфибий (Таежный клещ..., 1985). Наши исследования коснулись только группы мелких млекопитающих, учет которых проводили с помощью стандартных методик: ловчих канавок и ловушко-линий. На период начала наших исследований (2006 г.) основное внимание было уделено группе прокормителей, играющей ведущее значение на территории проведения исследований в поддержании популяции таежного клеща, являвшегося здесь основным переносчиком КЭ. На исследуемой территории обитает 10 видов насекомоядных (Soricomorpha) и 22 видов грызунов (Rodentia) (Равкин и др., 1996; Цыбулин и др., 2007; Вартапетов и др., 2008; Панов, 2011). Однако для учета части видов (еж, белка, бурундук и др.) необходимо применение специальных методик, к тому же их численность несопоставимо мала в условиях рекреационных территорий ННЦ, чем группы мелких грызунов и насекомоядных, поэтому они были исключены из анализа. Как будет показано позднее, участие в прокормлении разных видов мелких млекопитающих различно. Особи некоторых видов сильно поражены

преимагинальными фазами клеща, но их численность слишком мала (например, обыкновенный хомяк). Другие прокармливают мало личинок и нимф, но их численность достаточно велика - обыкновенная бурозубка (Бахвалова и др., 2001). Поэтому в качестве модельных видов при исследовании прокармливания преимаго иксодовых клещей выбраны виды, относительно многочисленны на протяжении многих лет и достаточно «поражаемые» личинками и нимфами. Это красная (*M. rutilus*) и красно-серая (*M. rufocanus*) полевки, полевая мышь (*Ap. agrarius*) и обыкновенная бурозубка (*S. araneus*).

В среднем за период 2006 – 2014 гг. численность мелких млекопитающих составила  $42,5 \pm 7,9$  экз./100 цс, в том числе насекомоядных –  $25,8 \pm 6,8$  экз./100 цс, (64% от общей численности мелких млекопитающих), грызунов значительно меньше –  $16,7 \pm 1,9$  экз./100 цс (36%), ( $p < 0,01$ ).

Изменения численности насекомоядных и грызунов различаются по амплитуде, но происходят довольно синхронно. Так, за период исследований 1980 – 2014 гг. (по данным В. В. Панова) корреляция между ними высоко достоверна:  $r_{33} = 0,62$ ,  $p < 0,001$ ; Рисунок 5 представляет лишь период 2006 – 2014 гг.).

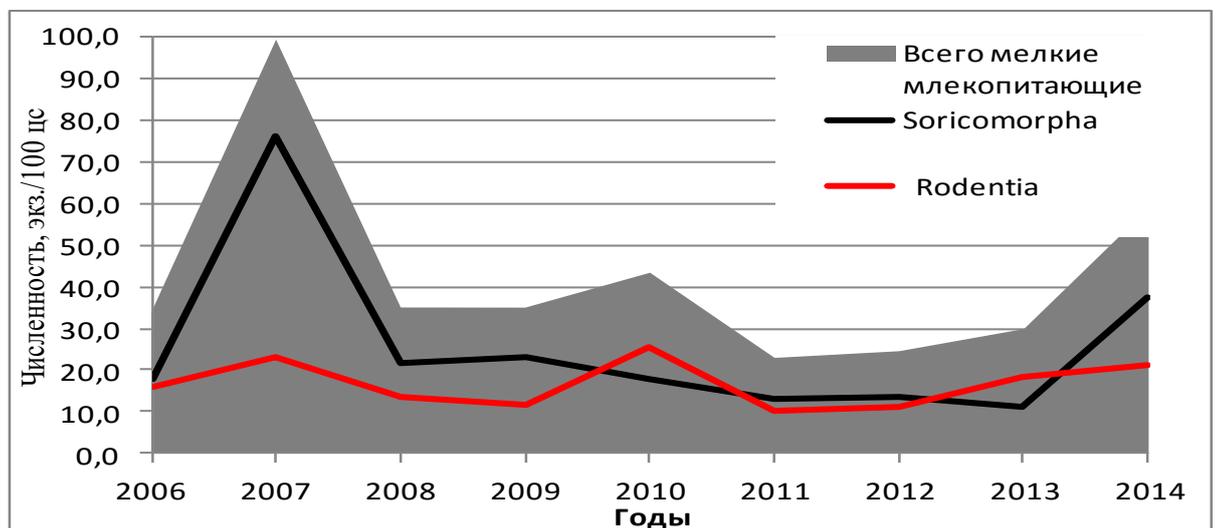
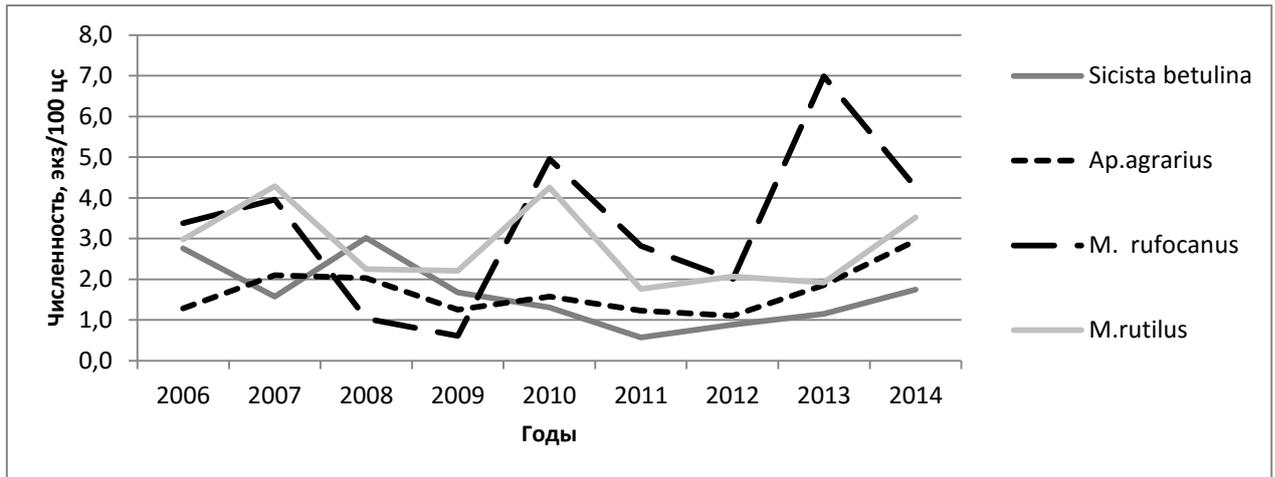


Рисунок 5. Численность мелких млекопитающих (Soricomorpha и Rodentia) в лесопарке Новосибирского научного центра 2006 – 2014 гг.

За период наших исследований (2006 – 2014 гг.) отмечено 3 пика суммарной численности мелких млекопитающих (2007, 2010, 2014 гг.). Численность отряда грызунов достигала минимума в 2006, 2009 и 2011 гг.

составив  $16,0 \pm 3,2$  экз./100цс,  $11,8 \pm 4,5$  экз./100цс и  $10,0 \pm 1,4$  экз./100цс, соответственно. К массовым видам грызунов на территории лесопарка ННЦ отнесли: красно-серую полевку, среднесезонная численность которой составила  $3,3 \pm 1,0$  экз./100цс; красную полевку –  $2,8 \pm 1,2$  экз./100цс; полевую мышшь –  $1,7 \pm 0,5$  экз./100цс и лесную мышовку –  $2,3 \pm 0,6$  экз./100цс (Рисунок 6).

Рисунок 6. Среднесезонная динамика численности массовых видов отряда



грызунов.

Среднесезонная численность массовых видов грызунов и в целом отряда грызунов высокодостоверно коррелировали ( $r = 0,9$ ). Однако, межвидовое изменение среднесезонной численности происходило асинхронно.

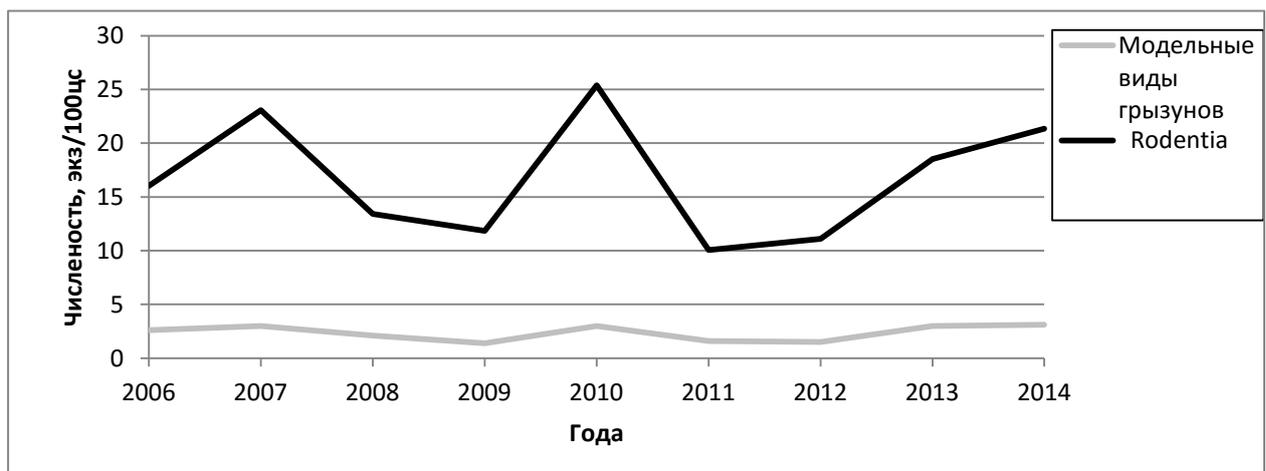


Рисунок 7. Среднесезонная динамика численности модельных видов грызунов и отряда Rodentia

Исследование долевого участия модельных видов в структуре сообщества мелких млекопитающих показало, что на долю модельных видов пришлось 56,4% всей численности группы грызунов (доля красно-серой полевки – 19,8%, красной полевки – 16,7%, полевой мыши – 10,2 и лесной мышовки – 9,6%). Остальные виды грызунов малочисленны и редки, хотя в отдельные годы их обилие может существенно возрастать. Минимумы численности отряда насекомоядных пришлись на 2006 и 2013 годы, составив  $17,9 \pm 8,0$  экз./100цс и  $11,3 \pm 6,1$  экз./100цс, соответственно. Доминирующее положение в структуре отряда занимает обыкновенная бурозубка, усредненная численность которой составила  $13,8 \pm 4,9$  экз./100цс, содоминанты – малая бурозубка  $6,2 \pm$  экз./100цс и средняя бурозубка  $4,1 \pm 1,4$  экз./100цс (Рисунок 8). Изменения среднесезонной численности бурозубки обыкновенной и бурозубок средней и малой синхронно и коррелирует ( $r = 0,86$  и  $r = 0,96$ ).

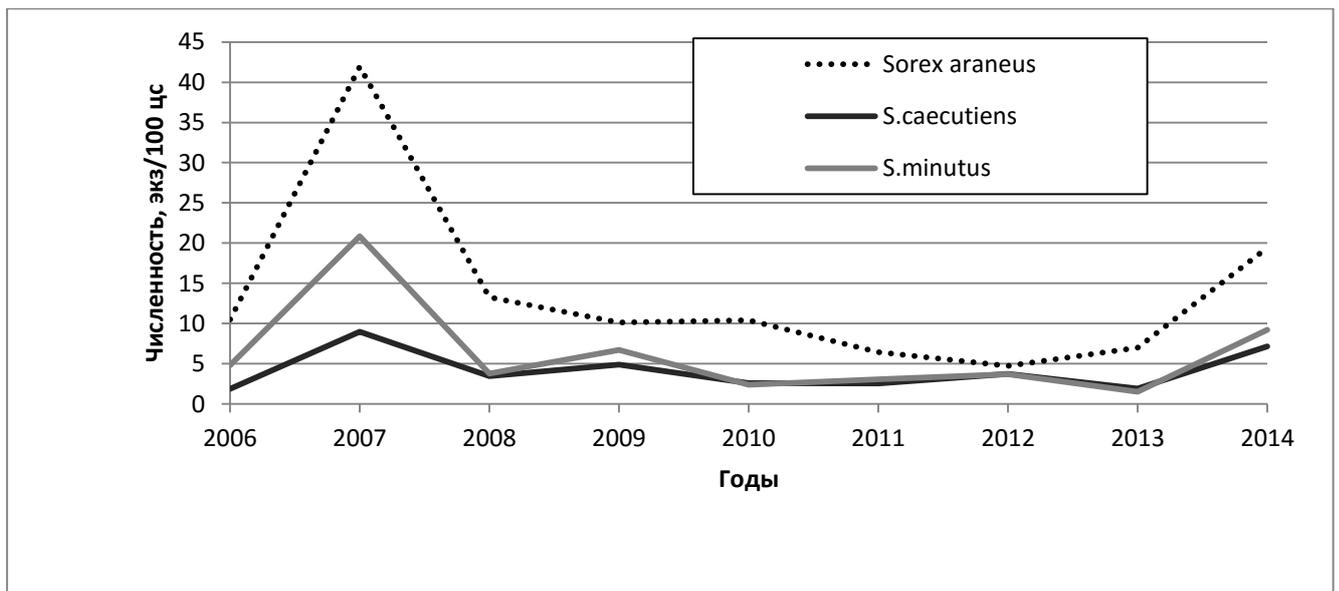


Рисунок 8. Динамика численности доминирующих видов отряда насекомоядных

На долю массовых видов насекомоядных в структуре численности их отряда пришлось 93,4% всей численности: доля бурозубки обыкновенной – 53,5%, бурозубки средней – 15,9%, бурозубки малой – 24,0%. На долю остальных видов приходится менее 10% численности, но в отдельные годы их доля

возрастает. В годы снижения численности вида доминанта (2012 г.) численность содоминантов увеличивается (Рисунок 9).

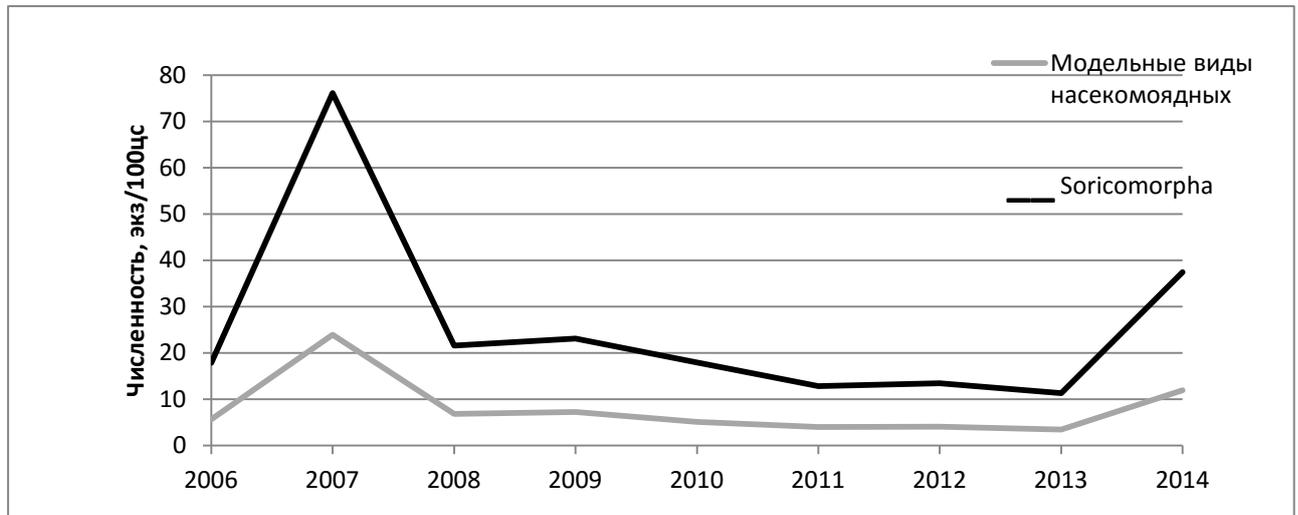


Рисунок 9. Среднесезонная динамика численности модельных видов насекомых и отряда Soricomorpha

#### 4.2. Пораженность мелких млекопитающих преимагинальными фазами развития иксодовых клещей

Свои наблюдения мы проводили с июня по август в период с 2006 по 2014 гг. Клещей собирали только со свежееотловленных, пойманных ловушко–линиями животных. Всего обследовано 4413 экз. мелких млекопитающих, относящихся к 15 видам. С них собрано 12029 экз. клещей, из которых – 10095 экз. личинки и 1934 экз. нимфы. В качестве хозяев преимагинальных фаз иксодовых клещей зарегистрированы почти все отловленные мелкие млекопитающие.

Два вида пастбищных иксодовых клещей – *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*, занимающих доминирующее положение в структуре сообщества иксодид на территории лесопарка ННЦ и являющиеся близкородственными видами, для существования нуждаются в сходных экологических условиях окружающей среды. Изучение трофических связей *I. pavlovskyi* в зоне совместного обитания с *I. persulcatus* выявило, что у имаго весьма отчетливо выражена трофическая

специализация к птицам на млекопитающих встречается редко. Но обе преимагинальные фазы (личинки и нимфы) паразитируют, как и *I. persulcatus*, равно на птицах и мелких и средних млекопитающих. При этом преимаго двух видов клещей нередко встречаются на хозяевах одновременно (Филиппова, 1977).

Степень участия видов мелких млекопитающих в прокормлении преимаго иксодовых клещей оценивали по показателям экстенсивности, интенсивности инвазии и показателям прокормления в период 2006 – 2014 гг.

Из 22 видов грызунов и 10 видов насекомоядных, обитающих на изучаемой территории, по эктопаразитологическим показателям исследовано 10 видов грызунов и 5 видов насекомоядных (Таблица 6), к которым можно было применить вышеизложенные методики учета численности мелких млекопитающих.

Среди представителей отряда грызунов личинками иксодовых клещей чаще всего были поражены рыжая полевка, красная полевка, полевая мышь и лесная мышовка; реже всего были поражены темная полевка и обыкновенная полевка. Среди насекомоядных наибольшая пораженность была отмечена у обыкновенной бурозубки и обыкновенной куторы; реже личинок снимали со средней бурозубки.

Большую пораженность зверьков нимфами наблюдали у лесной мышовки и полевой мыши. Темная полевка и обыкновенная полевка очень редко прокармливали нимф иксодид. Насекомоядные практически не участвуют в прокормлении нимф.

Высокий индекс обилия (Ио) личинок выявлен у полевой мыши и красной полевки, низкий характерен для темной и обыкновенной полевки. Среди насекомоядных Ио личинок выше 1,0 был выявлен только у куторы обыкновенной.

Самые высокие показатели прокормления личинок среди видов грызунов отмечены у красной полевки и полевой мыши. Среди насекомоядных – только у обыкновенной бурозубки.

Экстенсивность и интенсивность поражения предимагинальными фазами развития пастбищных иксодовых клещей мелких млекопитающих, отловленных в лесопарке ННЦ, 2006 – 2014 гг.

Вид	Численность , экз./100цс	Число очесанных животных	Ив, %		Ио, экз./ос И <sub>ПП</sub>	
			Личинок	Нимф	Личин ок	Нимф
Грызуны						
Красная полевка	2,8	492	85,6	39,0	<u>7,3</u> 20,4	<u>1,1</u> 3,1
Полевая мышь	1,7	357	80,4	45,0	<u>8,9</u> 15,1	<u>1,6</u> 2,7
Красно-серая полевка	3,3	288	62,8	24,6	<u>2,8</u> 9,2	<u>0,6</u> 2,0
Лесная мышовка	1,6	138	79,0	55,8	<u>4,6</u> 7,4	<u>2,5</u> 4,0
Темная полевка	1,4	148	41,2	14,1	<u>1,0</u> 1,4	<u>0,1</u> 0,1
Рыжая полевка	1,5	64	89,1	39,1	<u>5,9</u> 8,9	<u>0,8</u> 1,2
Мышь-малютка	0,7	57	77,2	36,8	<u>4,1</u> 2,9	<u>1,3</u> 0,9
Обыкновенная полевка	1,1	133	51,1	18,0	<u>1,9</u> 2,1	<u>0,4</u> 0,4
Мышь лесная азиатская	1,0	59	67,8	25,4	<u>2,5</u> 2,5	<u>0,1</u> 0,1
Узкочерепная полевка	0,1	71	71,8	32,4	<u>3,6</u> 0,4	<u>0,8</u> 0,1
Насекомоядные						
Обыкновенная бурозубка	13,8	438	28,8	4,1	<u>0,8</u> 11,0	<u>0,05</u> 0,7
Малая бурозубка	6,2	116	11,2	0,8	<u>0,1</u> 0,6	<u>0,01</u> 0,1
Средняя бурозубка	4,1	93	9,7	4,3	<u>0,1</u> 0,4	<u>0,03</u> 0,1
Обыкновенная кутора	0,7	31	29,0	6,5	<u>1,6</u> 1,1	<u>0,1</u> 0,1

Показатель прокормления нимф у лесной мышовки составил 4,0. Незначительно ниже он у красной полевки, полевой мыши и рыжей полевки. У остальных исследуемых видов Ипп нимф не превышал 1,0.

Анализ экстенсивности поражения (Ив, %) млекопитающих личинками иксодовых клещей показал, что представители грызунов были поражены чаще личинками иксодовых клещей, чем насекомоядные.

Таким образом, на территории лесопарка ННЦ большая роль в прокормлении преимаго клещей принадлежит отряду грызунов. Основными видами-прокормителями являются красная полевка и полевая мышь. Среди насекомоядных основным видом-прокормителем является обыкновенная бурозубка.

Основными прокормителями являются виды, обладающие высокой численностью и значительной интенсивностью инвазии неполовозрелыми фазами развития клещей. Так, на изучаемой территории основными прокормителями личинок пастбищных иксодовых клещей являлись красная полевка, полевая мышь и обыкновенная бурозубка. Все перечисленные виды имели высокие индексы прокормления ( $> 10,0$ ) и при очесах зверьков с этих видов было снято  $70,6 \pm 0,4\%$  личинок. Второстепенными прокормителями выступают виды, обладающие высокой численностью и средними индексами обилия преимаго клещей. К этой группе были отнесены 7 видов грызунов – полевки красно-серая, рыжая, обыкновенная, темная, а также мышовка лесная, мышь-малютка и мышь лесная азиатская. Их Ипп варьировал в пределах ( $< 10,0 - 1,0$ ); из них личинок  $27,0 \pm 0,4\%$ . Практически не участвуют в прокормлении виды, у которых один или оба эти показатели низки. К таким видам нами была отнесена – полевка узкочерепная (Ипп – 0,4; личинок  $1,5 \pm 0,9\%$ ).

Для нимф основными прокормителями являлись – мышовка лесная, полевка красная и мышь полевая – Ипп 4,0 – 2,7. Всего  $75,5 \pm 1,0\%$ . Второстепенными прокормителями выступили 6 видов грызунов и один вид насекомоядных. Их Ипп варьировал от 2,0 до 0,1;  $23,6 \pm 0,9\%$  нимф. Виды, не имеющие большого значения в прокормлении нимф: мышь лесная азиатская, бурозубки

обыкновенная, малая, средняя, имеющие низкие Ипп – 0,1 прокармливали 0,9 ± 0,4% нимф. Градации классов Ипп рассчитывали по Лукьяновой, Сапегинной (1967).

Итак, на территории антропоургического очага КЭ грызуны имеют большее значение в прокормлении личинок и нимф иксодовых клещей, чем насекомоядные. Основными прокормителями как личинок, так и нимф являются красная полевка и полевая мышь. Один вид насекомоядных – обыкновенная бурозубка, в силу своей многочисленности, при низком Ио личинок также является основным прокормителем данной фазы развития клещей, в то время как лесная мышовка при низкой численности, но высоком Ио нимф является основным прокормителем нимф.

### **4.3. Уровень серопозитивности мелких млекопитающих**

Репродукция ВКЭ в организме мелких млекопитающих – резервуарных хозяев и прокормителей личинок и нимф иксодовых клещей, сопровождается формированием гуморального противовирусного иммунитета, показателем которого служит наличие в крови зверьков разных видов противовирусных антител, в частности, антигемагглютининов (АГА) к ВКЭ. В связи с основной ролью в прокормлении преимаго клещей красной полевки и полевой мыши уровень противовирусного иммунитета определяли именно у этих видов. Наличие АГА определяли в РТГА (см. главу 2).

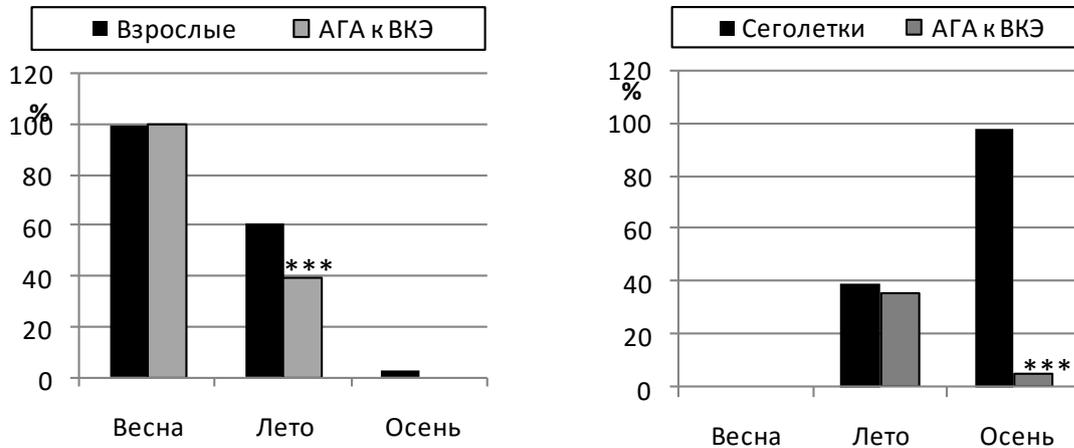
За все время исследований антигемагглютинины к ВКЭ выявлены в 66 из 195 проб крови красной полевки, т.е. доля серопозитивных зверьков этого вида составила – 33,8 ± 3,4%, с межгодовыми колебаниями от нуля до 56,9 ± 7,0%. Титры АГА варьировали от 1:10 до 1:320 при среднегеометрическом титре АТ (СГТ) 19,5 ± 1,5. В сыворотках крови полевой мыши АГА АТ к ВКЭ выявили в 12,6 ± 2,3%, с межгодовыми колебаниями от нуля до 31,0 ± 7,5%, при варьировании титров от 1:10 до 1:80; СГТ составлял 18,6 ± 1,1. При

межвидовом сравнении доля серопозитивных к ВКЭ особей красной полевки оказалась достоверно ( $p < 0,001$ ) выше, чем у полевой мыши. При этом для СГТ достоверных межвидовых различий не выявлено. Помимо, межгодовых различий в частоте детекции серопозитивных особей у красной полевки и полевой мыши существуют различия по ходу эпизоотического сезона. Это связано с сезонными изменениями в структуре популяции прокормителей. Так, у красной полевки и полевой мыши в апреле – начале мая отловлены только взрослые особи. Летом доля взрослого поголовья сокращается у красной полевки до  $60,6 \pm 4,1\%$ , а у полевой мыши до  $48,1 \pm 4,4\%$ . В сентябре-октябре доля перезимовавших взрослых особей становится незначительной, составляя у красной полевки  $2,3 \pm 2,3\%$ , а у полевой мыши –  $4,7 \pm 2,7\%$  (Рисунок 10).

Исследование изменения доли серопозитивных зверьков (АГА АТ к ВКЭ) и возрастной структуры популяции выявило достоверные корреляции у красной полевки ( $r = 0,9$ ) и полевой мыши ( $r = 0,7$ ).

Доля зверьков, содержащих в крови АГА АТ к ВКЭ, у красной полевки достоверно ( $p < 0,001$ ) выше, чем у полевой мыши, при схожих СГТ. Возрастная структура существенно влияет на уровень серопозитивности вида: с уменьшением доли взрослых особей снижается количество зверьков содержащих АГА АТ к ВКЭ.

## Красная полевка



## Полевая мышь

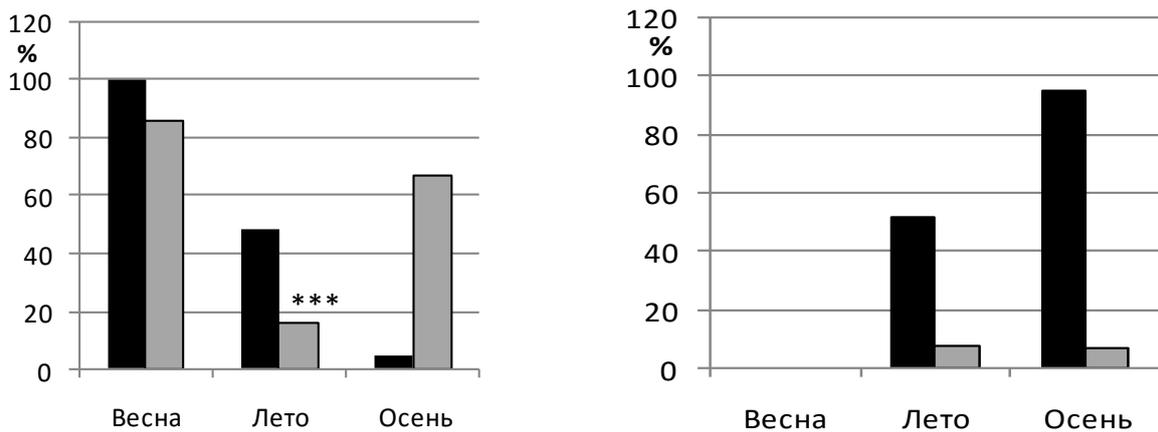


Рисунок 10 Изменение возрастной структуры популяции красной полевки/полевой мыши и доли особей, содержащих в крови антигемагглютинирующие антитела к ВКЭ

#### 4.4. Детекция ВКЭ у мелких млекопитающих

Уровень спонтанного вирусоносительства клещевого энцефалита комплексом вирусологических, молекулярно–генетических и серологических методов (см. главу «Материалы и методы») детектировали в образцах головного мозга и селезенки красной полевки и полевой мыши (Таблица 7).

Антиген Е ВКЭ был детектирован в 13 особях красной полевки и 4 особях полевой мыши. Методом биологической пробы на НЛМ из головного мозга красной полевок был выделен один биологический изолят ВКЭ, что было подтверждено исследованиями в реакции биологической пробы на НЛМ. Последующее интрацеребральное заражение НЛМ суспензиями органов полевой мыши положительных результатов не дало. В исходных пробах органов РНК ВКЭ был детектирован с использованием двух вариантов ОТ–ПЦР, в результате чего РНК ВКЭ была выявлена в органах 42 красных полевок и 23 полевых мышах (Таблица 7).

Таблица 7

Отличия частот детекции ( $\% \pm m^1$ ) субвирионных компонентов (белка Е и РНК ВКЭ) и патогенного вируса КЭ в гомогонатах органов красной полевки и полевой мыши

Вид животных, органы	Белок Е ВКЭ (ИФА)	РНК ВКЭ (ОТ–ПЦР)	Патогенный для НЛМ ВКЭ (Биопроба)
Красная полевка (n=59)			
Головной мозг	15,3±0,6 <sup>*,†</sup>	64,4±6,3 <sup>*</sup>	1,7±1,7
Селезенка	20,0±8,2 <sup>*,†</sup>	68,0±9,5 <sup>*</sup>	–
Всего на особь	22,0±5,4 <sup>*,†</sup>	71,2±5,9 <sup>*</sup>	1,7±1,7
Полевая мышь (n=79)			
Головной мозг	1,3±1,3 <sup>†</sup>	20,3±4,6	–
Селезенка	8,3±4,7 <sup>†</sup>	36,1±8,1	–
Всего на особь	5,1±0,1 <sup>†</sup>	29,1±5,1	–

Примечание: <sup>1</sup> – доля положительных образцов; достоверные отличия: <sup>\*</sup> – межвидовые по отдельным показателям <sup>†</sup> – внутривидовые между разными субвирионными компонентами.

Межвидовые различия в частоте детекции антигена Е ВКЭ достоверны ( $p < 0,01$ ). Достоверных отличий в частотах детекции антигена Е ВКЭ между органами (головной мозг, селезенка) не выявлено ни у красной полевки, ни у полевой мыши. Таким образом, в пробах красной полевки достоверно чаще детектировали антиген Е, РНК и патогенный для НЛМ ВКЭ, чем в пробах полевой мыши.

Вероятно, большую долю зверьков, у которых выявляется только РНК ВКЭ, можно связать с явлением персистенции данного вируса в организме зверьков.

#### **4.5. Результаты молекулярного типирования изолятов РНК ВКЭ в органах млекопитающих**

Выделенные из органов красной полевки и полевой мыши изоляты РНК ВКЭ с целью генотипирования были исследованы в ОТ–ПЦР РВ с генотипспецифичными зондами (см. п/р. «Методы», глава 2). В результате в семи образцах красной полевки типировали два генетических типа РНК ВКЭ в виде смешанной инфекции – Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ; в 14 образцах - в виде моноинфекции – Сиб-ВКЭ – 9 изолятов, ДВ – 5 изолятов. В 12 образцах полевой мыши выявлены три генетических типа РНК ВКЭ – Сиб-ВКЭ, ДВ-ВКЭ и Евр-ВКЭ. В виде смешанной инфекции - четыре изолята, Сиб-ВКЭ + ДВ-ВКЭ – 3 изолята; Сиб-ВКЭ + Евр-ВКЭ – 1 изолят. В восьми образцах была генотипирована моноинфекция – 3 изолята РНК Сиб-ВКЭ; 5 изолятов РНК ДВ-ВКЭ ВКЭ (таблица 8).

Частоты встречаемости моно- и смешанной форм инфекции КЭ ( $\% \pm m^1$ ) с последующим генотипированием изолятов вируса у особей млекопитающих (только положительные образцы)

Виды мелких млекопитающих	Формы инфекции	
	Моноинфекция (Сиб-ВКЭ, ДВ-ВКЭ, Евр-ВКЭ)	Смешанная инфекция (ДВ-ВКЭ+Сиб-ВКЭ, Сиб-ВКЭ+Евр-ВКЭ)
Полевка красная (n = 21) <sup>2</sup>	66,7±10,5 <sup>a</sup>	Сиб-ВКЭ+ДВ-ВКЭ 33,3±10,5
Мышь полевая (n = 12)	75,0±13,0 <sup>b</sup>	Сиб-ВКЭ+ДВ-ВКЭ 16,7±11,2 Сиб-ВКЭ+Евр-ВКЭ 8,3±8,3

Примечание:<sup>1</sup>-% особей, содержащих РНК ВКЭ; m - статистическая ошибка, %;<sup>2</sup> – количество положительных образцов; <sup>a</sup>(p < 0,01) отличия частот детекции моноинфекции и смешанной инфекции ВКЭ у красной полевки; <sup>b</sup>(p < 0,05) отличия частот детекции моноинфекции и смешанной у полевой мыши

## Глава 5. СЕЛЕКТИВНОЕ ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЗМА МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ФОРМИРОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО СОСТАВА ВИРУСА

Исходя из предыдущих заключений о доминантном положении видов в прокормлении фаз преимаго, в качестве модельных нами были выбраны животные видов красная полевка и полевая мышь. Для красной полевки Ио личинок 7,3 экз./ос., Ипп 20,4. Для полевой мыши Ио личинок 8,9 экз./ос., Ипп 15,1. В том числе, при высоких показателях инвазированности и возможности высокого индивидуального поражения (до нескольких десятков на особь) преимагинальными фазами развития клещей, они были выбраны в качестве модели изучения отбора отдельных генотипов ВКЭ в организме прокормителей преимаго иксодид после дозированного подкожного заражения клещевой суспензией содержащей РНК Сиб-ВКЭ и ДВ-ВКЭ.

Отловленных красных полевок и полевых мышей в течение месяца выдерживали в карантине (в соответствии с п. 2.11.20 СП 1.3.3118-13), после чего у них брали кровь из ретроорбитального синуса для вирусологических, серологических и молекулярно-генетических исследований (см. главу «Материалы и методы») наличия спонтанной инфицированности КЭ.

В экспериментальную группу вошли животные с отрицательными результатами в вирусологических и серологических исследованиях - 36 экз. красных полевок и 30 экз. полевых мышей. Животных инфицировали подкожно по 2,92 Ig LD<sub>50/0,25</sub> вирусосодержащей суспензией, приготовленной из инфицированных клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, в которой предварительно установлен генотипический состав РНК ВКЭ: Сиб и ДВ.

В течение всего периода наблюдения после подкожного заражения ВКЭ ни у одного из диких мелких млекопитающих клинических проявлений КЭ выявлено не было. При этом, начиная с 30-х суток и до конца периода наблюдения, у всех зверьков в крови детектировали наличие АГА и ВН АТ.

Исследование крови и органов (головной мозг и селезенка) экспериментально зараженных диких животных показало присутствие РНК Сиб-ВКЭ и ДВ-ВКЭ (Таблица 9).

При одновременном введении РНК Сиб-ВКЭ и ДВ-ВКЭ одновременное присутствие обоих генетических типов было выделено в двух образцах крови: по одному у красной полевки (60-е сутки) и полевой мыши (8-е сутки). Во всех остальных положительных пробах генотипировали только один генотип РНК ВКЭ. В образцах крови и органах красной полевки РНК ДВ-ВКЭ детектировали до 120-х суток после заражения; РНК Сиб-ВКЭ до 90-х. В образцах крови и органов полевой мыши РНК Сиб-ВКЭ и ДВ-ВКЭ детектировали до 120-х суток.

Таблица 9

Варианты детекции генетических типов ВКЭ у мелких млекопитающих после дозированного подкожного заражения

Орган, кровь	ВКЭ	Период наблюдения, сутки							
		2	4	8	16	30	60	90	120
Красная полевка (n=36)									
Кровь	Сиб	-	+	+	-	-	+	-	-
Мозг	Сиб	-	-	+	-	-	+	-	-
Селезенка	Сиб	-	-	+	-	-	+	-	-
Кровь	ДВ	+	+	+	-	-	+	+	+
Мозг	ДВ	+	+	+	+	+	-	+	+
Селезенка	ДВ	+	-	+	-	+	+	-	-
Полевая мышь (n=30)									
Кровь	Сиб	-	-	+	Ни	+	-	+	+
Мозг	Сиб	-	-	-	Ни	-	-	-	-
Селезенка	Сиб	-	-	-	Ни	-	-	-	-
Кровь	ДВ	-	+	+	Ни	-	-	+	+
Мозг	ДВ	+	+	-	Ни	-	-	+	-
Селезенка	ДВ	+	-	-	Ни	-	-	-	-

Примечание: + РНК ВКЭ детектировали; - РНК ВКЭ не детектировали

У обоих видов грызунов при длительном персистировании ВКЭ происходит периодический выброс РНК в кровь, что может отражать способность заражению вирусом питающихся клещей.

Результаты эксперимента показывают наличие длительной персистенции ВКЭ в эксперименте на двух видах грызунов – естественных прокормителей неполовозрелых стадий развития иксодовых клещей. Изучение генетического состава РНК ВКЭ в период персистентной инфекции показало наличие селективного отбора КЭ украинской полевки и отсутствие такового у полевой мыши.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Территория лесопарковой зоны Новосибирского научного центра (ННЦ) занимает площадь свыше 90 км<sup>2</sup> и представляет собой совокупность мозаично распределенных пригодных для обитания мелких млекопитающих биотопов: мелколиственных лесов, березовых колков, сосновых боров, расположенных на расчлененном рельефе с присутствием небольших водоемов – лесных озер и мелких речушек. В разреженном мелколиственном лесу была отмечена наивысшая численность клещей. В сосновом бору с примесью березы, в березово-осиновому лесу и в сосновом бору численность клещей варьировала в пределах средней и высокой. Таким образом, было выявлено, что распределение иксодовых клещей по территории лесопарковой зоны ННЦ неравномерно, мозаично и зависит от геоботанических параметров с повышенной численностью в мелколиственном разреженном лесу и наименьшей в сосновом бору. По усредненным показателям с четырех ключевых участков, различающихся по геоботаническим условиям, территория лесопарка ННЦ по градиционной шкале относится к категории с высокой численностью пастбищных иксодовых клещей.

Выявленный рост численности пастбищных иксодид связан с увеличением численности *I. pavlovskyi*, при том, что численность *I. persulcatus* сопоставима с таковой за 1980 – 2000 гг. Изучение пространственного распределения иксодид показало, что *I. pavlovskyi* занимает доминирующее положение в структуре сообщества иксодовых клещей на территории лесопарка ННЦ. Однако, за пределами лесопарка ситуация по численности и видовому составу сообщества клещей не изменилась: *I. persulcatus* остается доминирующим видом клещей почти во всех пригодных для его жизнедеятельности биотопах на всей территории Западной Сибири.

Изучение спонтанного вирусоносительства у двух массовых видов иксодовых клещей показало, что в клещах Павловского достоверно чаще детектировали антиген Е, РНК ВКЭ и выявляли патогенный вирус, чем в таежных клещах, для которых характерна индикация только РНК ВКЭ. Возбудитель КЭ в

организме клещей был представлен тремя генетическими типами ВКЭ с преобладанием Сиб-ВКЭ. Все три генетических типа вируса были представлены в основном в виде моноинфекции, реже смешанной инфекции. Вероятно, это связано со структурой очагов КЭ на территории ННЦ и способностью вируса адаптироваться к различным видам хозяев.

Личинки таежного клеща и клеща Павловского при подстерегании прокормителя поднимаются по растительности на высоту 5 – 35 см от поверхности земли, где проявляют активность мелкие млекопитающие. Несмотря на то, что в прокормлении преимаго иксодид принимают участие практически все виды мелких млекопитающих фауны лесопарковой зоне ННЦ, основное значение в данном процессе принадлежит трем видам: красной полевке, обыкновенной бурозубке и полевой мыши. При этом, как экстенсивность, так и интенсивности поражения преимагинальными фазами развития пастбищных иксодовых клещей у представителей отряда грызунов были достоверно выше, чем у представителя отряда насекомоядных – обыкновенной бурозубки.

Уровень иммунной прослойки имеет выраженные видовые различия. У красной полевки доля зверьков, содержащих в крови антигемагглютинирующие антитела к ВКЭ, была достоверно выше, чем у полевой мыши. Также на уровень серопозитивности влияла возрастная структура вида: с уменьшением доли взрослых зверьков снижается количество зверьков, содержащих в крови АГА АТ к ВКЭ.

Изучение спонтанного вирусоносительства КЭ у красной полевки и полевой мыши показало, что частота детекции антигена Е и РНК ВКЭ достоверно выше у красной полевки. Молекулярное типирование РНК ВКЭ выявило присутствие двух генетических типов у красной полевки – Сиб-ВКЭ и ДВ-ВКЭ в виде моно- и смешанной инфекции, с достоверным преобладанием моноинфекции Сиб-ВКЭ. У полевой мыши детектировали три генетических типа РНК ВКЭ: Сиб-ВКЭ, ДВ-ВКЭ и Евр-ВКЭ в обеих формах инфекции с достоверным преобладанием моноинфекции ДВ-ВКЭ.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генов E и NS1 ВКЭ от клещей и из органов мелких млекопитающих показал инфекцию Сиб и ДВ генотипами ВКЭ, что соответствовало результатам ОТ-ПЦР РВ с генотип-специфичными флуоресцентными зондами.

Проведенная экспериментальная работа по выяснению роли прокормителей преимаго иксодовых клещей – красной полевки и полевой мыши в селекции Сиб-ВКЭ и ДВ-ВКЭ при подкожном введении инфекционной клещевой суспензии показала наличие длительной персистенции КЭ в организме зверьков. Введенная в организм восприимчивых малочувствительных животных клещевая суспензия утратила антигенные свойства, но сохранила иммуногенные. Присутствие антигенагглютинирующих и вируснейтрализующих антител в крови зверьков, начиная с 30-х суток после заражения и до конца эксперимента, является косвенным свидетельством персистенции инфекции в организме. Исследование образцов крови и органов диких грызунов показало наличие селективного отбора генотипов ВКЭ у красной полевки и отсутствие такового у полевой мыши.

**ВЫВОДЫ:**

1. В период значительно возросшей численности иксодовых клещей на территории лесопарка ННЦ зарегистрирована смена доминирующего вида иксодид – *I. persulcatus* на *I. pavlovskiyi*, с которым связан регистрируемый рост численности переносчиков ВКЭ на территории ННЦ.
2. Основным прокормителем неполовозрелых иксодид помимо отмеченных ранее красной полевки и обыкновенной бурозубки на данной территории стала и полевая мышь.
3. В клещах *I. pavlovskiyi* достоверно чаще, чем в клещах *I. persulcatus* присутствует антиген Е, РНК и патогенный вирус клещевого энцефалита; у *I. persulcatus* наиболее часто отмечена только РНК вируса.
4. У красной полевки антиген Е, РНК и патогенный для лабораторных животных вирус КЭ отмечается достоверно чаще, чем у полевой мыши.
5. Анализ генетического состава РНК вируса клещевого энцефалита в период персистентной инфекции обнаружил селективный отбор генотипов вируса клещевого энцефалита в организме красной полевки и не выявил такового у полевой мыши.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Азарова, И. К. Изучение условий, способствующих высокой селективной зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита /И. К. Азарова, Н. П. Мишаева, А. Б. Тарасенко // Современные проблемы эпидемиологии, диагностики и профилактики клещевого энцефалита. Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума – Иркутск, 1990 –140 с.
2. Алексеев, А. Н. Искусственное дозированное кормление клещей *Ixodes persulatus* Sch. – основных переносчиков клещевого энцефалита // Паразитология. - 1971. – Т. 5. - № 5. – С. 392 – 400.
3. Алексеев, А. Н. Теория связи типов питания и пищеварения кровососущих членистоногих с их способностью быть специфическими переносчиками возбудителей трансмиссивных инфекций// Паразитология. – 1985. – Т.19 – № 1. – С. 3 – 7.
4. Алексеев, А. Н. Система клещ – возбудитель и ее эмерджентные свойства. - СПб.: Зоологический институт РАН. - 1993. – 204с.
5. Алексеев, А. Н. Современное состояние знаний о переносчиках клещевого энцефалита // Вопр. вирусологи. – 2007. - №5. – С 22 - 26.
6. Алексеев, А. Н. Особенности поведения клещей *Ixodes persulatus* Sch., зараженных вирусом клещевого энцефалита / А. Н. Алексеев, Л. А. Буренкова, С. П. Чунихин // Мед. Паразитол. – 1988. - №2. – С. 71 – 75.
7. Алексеев, А. Н. Обмен вирусом клещевого энцефалита между иксодовыми клещами, совместно питающимися на животных с подпороговым уровнем вирусемии / А. Н. Алексеев, С. П. Чунихин // Мед. паразитология и паразитарные болезни. – 1990а. - №2. – С. 48 - 51.
8. 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.

9. Балашов, Ю. С. Кровососущие клещи – переносчики болезней человека и животных – Л.:, 1967. – 318с.
10. Балашов, Ю. С. Паразитизм клещей и насекомых на наземных позвоночных. СПб: Наука. - 2009. - 358с.
11. Балашов, Ю. С. Структура сообществ паразитологических членистоногих мелких лесных млекопитающих // Паразитология – 2004. –№6. – С. 481 – 491.
12. Балашов, Ю.С. Иксодовые клещи - паразиты и переносчики инфекций. Л.: Наука. 1998. - 287 с.
13. Балашов, Ю.С. Паразит-хозяйинные отношения членистоногих и наземными позвоночными. – Л.: Наука, 1982. – 320с.
14. Бахвалова, В. Н. Экспериментальное изучение *in vivo* персистенции вируса клещевого энцефалита у красных полевок / В. Н. Бахвалова, А. К. Добротворский, О. В. Морозова // Междунар. науч. конф. Вирусные, риккетсиозные и бактериальные инфекции, переносимые клещами. – Иркутск, 1996. - С. 22 – 23.
15. Бахвалова, В. Н. Участие обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. (Insectivora, Soricidae) в циркуляции вируса клещевого энцефалита на юге Западной Сибири / О. В. Морозова, А. К. Добротворский, В. В. Панов, В. А. Матвеева, Р. В. Попова, С. А. Коробова // Паразитология.- 2001. - Т. 35. - № 5. - С. 376 – 385.
16. Бахвалова, В. Н., Взаимоотношения клещей *Ixodes persulcatus* и вируса клещевого энцефалита с красной полевкой (*Clethrionomys rutilus*) в Западной Сибири / О. В. Морозова, В. А. Матвеева, В. В. Панов, Л. Э. Матвеев, А. К. Добротворский // Паразитология. - 2003. - Т. 37. - № 1.- С. 18 – 30.
17. Бахвалова, В. Н. Персистенция вируса клещевого энцефалита в организме диких мелких млекопитающих и в культурах перmissive клеток / В. В. Панов, О. Ф. Потапова, В. А. Матвеева, Л. Э. Матвеев, О. В.

- Морозова // Дальневосточный Журнал Инфекционной Патологии. – 2007. - №11. – С. 79 – 87.
18. Бахвалова, В. Н. Распределение генетических типов вируса клещевого энцефалита среди спонтанно инфицированных иксодовых клещей и мелких млекопитающих на территории Новосибирской области / В. Н. Бахвалова, Г. С. Чичерина, В. В. Панов, В. В. Глупов [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015. – Т. 20. – №4.– С. 26 – 34.
  19. Бахвалова, В. Н. Биоразнообразие вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах и мелких млекопитающих на территории Новосибирской области / Г. С. Чичерина, В. В. Панов, В. В. Глупов, О. В. Морозова // Инфекционные болезни. – 2015. – Т. 13. - №4. – С. 15-21.
  20. Беклимишев, В. И. Термины и понятия, необходимые при количественном изучении популяции эктопаразитов и нидиколов//Зоологический журнал. – 1961. - №40 (2). – С.149 – 158.
  21. Белявская, Н.А. Персистенция ВКЭ на фоне пассивной иммунизации (Экспериментальные данные). Автореф. Дисс... канд. мед. наук., Томск, 1987. - 14 с.
  22. Беспятова, Л. А. Природные очаги клещевого энцефалита на северо-западной периферии обитания таежного клеща (*Ixodes persulcatus* Schulze, 1930) / С. В. Бугмырин, Ю. С.Коротков, Е. П. Иешко // Труды Карельского научного центра РАН - Петрозаводск, 2009. - №4. - С. 96 - 101.
  23. Беспятова, Л. А. Межгодовая динамика численности иксодовых клещей и формирование очага клещевого энцефалита в условиях средней тайги / Е. П. Иешко, Э. В. Ивантер, С. В. Бугмырин // Экология. - 2006. - №5.- С. 360 - 364.
  24. Богачек, М. В. Иммунохимические свойства белка ргМ и С-концевого фрагмента белка М вируса Западного Нила / Е. В. Протапопова, В.

- А.Тернова, А. В.Качко, А. В.Иванова, В. А. Иванисенко, А. Н. Швалов, В. Б. Локтев // Молекул. биология. – 2007. - №41 – С. 8-17.
25. Богданов, И. И. Население иксодовых клещей Алтайского края/ Д. И.Иванов, Н. В. Волокитин // Современные проблемы эпидемиологии, диагностики и профилактики клещевого энцефалита. – Иркутск. - 1990. – С. 23 – 24.
26. Богданов, И.И. Иксодовые клещи Западной Сибири. Сообщение VII. Типы населения иксодовых клещей // Электронный научный журнал «Вестник Омского государственного педагогического университета», выпуск 2006, [www.omsk.edu](http://www.omsk.edu)
27. Бугмырин, С. В.Численность личинок и нимф таежного клеща *Ixodes persulatus* (ACARI:IXODIDAE) у мелких млекопитающих на вырубках среднетаежной подзоны Карелии / Л. А.Беспятова, В. С. Аниканова, В. П. Иешко // Паразитология. - 2009. – 43 - №4. – С. 338 – 346.
28. Буренкова, Л.А. Фауна и экология иксодовых клещей – переносчиков клещевых инфекций человека в республике Тыва / Ю.С.Коротков, О.А.Белова, А.С.Шевцова, Л.Ю.Романова, В.В. Кудрявцев, Н.Д. Ооржак, М.О.Мижит, С.К.Селезнева, Г.Г. Карганова // Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова РАМН. – 2008. – Т. XXV. – С. 59 – 64.
29. Бусыгин, Ф. Ф., Эпидемиологическое районирование как основа дифференцированных мероприятий по профилактике клещевого энцефалита (на примере Омской и Новосибирской областей) / И. И.Богданов, В. И.Пригородов, П. И. Чудинов // Природно-очаговые инфекции и инвазии. – Омск. - 1984. - С. 91-103.
30. Вартапетов, Л. Г., Зонально-ландшафтное распределение насекомоядных млекопитающих (Insectivora, Mammalia) Верхнего Приобья / В. В.Панов, С. М. Цыбулин, И. Н. Богомоллова // Сибирский экологический журнал. - 2008. - Т. 15. - № 5. - С. 803 – 812.

31. Верета, Л. А. Принципы прогнозирования заболеваемости клещевым энцефалитом. М.: Изд-во «Медицина», 1975. - 135с.
32. Верховина, М. М. Эколого-генетический анализ региональной популяции вируса клещевого энцефалита в Восточной Сибири / М. М. Верховина, В. И. Злобин, И. В. Козлова, Т. В. Демина [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2007. – Т. 126- №4. – С. 53 – 59.
33. Верховина, М. М. Географические и экологические аспекты генетической вариабельности ВКЭ / М. М. Верховина, И. В. Козлова, Т. В. Демина, Ю. П. Джигоев [и др.] // Всероссийская науч.-практ. конф. «Современная ситуация и перспективы борьбы с клещевыми инфекциями в XXI веке», Томск, 2006. – С. 30 -31.
34. Вершинский, Б.В. Палеографические факторы становления природных очагов клещевого энцефалита и современная структура нозоареала // Паразитологический сборник. – Л.: Наука, 1984. – Вып. 32. – С. 124-138.
35. Вотяков, В. И. Клещевые энцефалиты Евразии/ В. И. Вотяков, В. И. Злобин, Н. П. Мишаева. – Новосибирск, 2002. – 438с.
36. Галимов, В. Р. Влияние климата, рельефа и растительности на вирусофорность таежных клещей и биологические свойства возбудителя клещевого энцефалита (КЭ) // Условия существования очагов клещевого энцефалита в Западной Сибири сб. научн. работ. - Л., 1974. – С. 8-13.
37. Герасимов, С. Г. Взаимодействие сибирского и дальневосточного подтипов вируса клещевого энцефалита при микстинфекции в организме млекопитающих. I. Факторы, влияющие на тип взаимодействия / С. Г. Герасимов, В. В. Погодина, Н. М. Колясникова, Л. С. Карань [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2011а. - №2. - С. 19 – 22.
38. Герасимов, С. Г. Взаимодействие сибирского и дальневосточного подтипов вируса клещевого энцефалита при микстинфекции в организме млекопитающих. Конкуренция подтипов при острой и интранзиторной инфекции / С. Г. Герасимов, В. В. Погодина, Н. М. Колясникова, Л. С. Карань [и др.] // Вопр. Вирусол. – 2011б. - №3. – С. 41 – 44.

39. Григорьев, М. А. Опыт применения промерзания почвы для прогнозирования природных эпидемических явлений (на примере развития Тарского очага клещевого энцефалита в Омской области) / М. А. Григорьев // Экология: от Арктики до Антарктики: материалы Конференции молодых ученых, Ин-т экол. раст. и животных УрО РАН. – Екатеринбург, 2007. – С. 68 – 71.
40. Громов, И. М. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий: Зайцеобразные грызуны / И. М. Громов, М. А. Ербаева. – СПб., 1995. – 522с.
41. Данчинова, Г. А. Фауна и экология популяции иксодовых клещей – переносчиков клещевых инфекций в Прибайкалье / Г. А. Данчинова, М. А. Хаснатинов, С. С. Шулунов, Е. В. Арбатская [и др.] // БЮЛЛЕТЕНЬ ВСНЦ СО РАМН. - 2007. - №3 (55). Приложение. - С. 86 – 89.
42. Демина, Т. В. Молекулярная эпидемиология вируса клещевого энцефалита: географическая вариабельность, определяемая методом молекулярной гибридизации / Т. В. Демина, Ю. П. Джигоев, М. М. Верховзина, И. В. Козлова [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. - 2009. - №3 (46).- С. 27 – 39.
43. Дживанян, Т. И. Изменение зависимых от хозяина характеристик вируса клещевого энцефалита при его адаптации к клещам и переадаптации к белым мышам / Т. И. Дживанян, М. Б. Королев, Г. Г. Карганова, В. М. Лисак [и др.] // Вопросы вирусологии. – 1988. - №5. – С. 589 – 595.
44. Добрикова, Е.Ю. Анализ 5'- и 3'-концевых некодирующих областей генома / Е. Ю. Добрикова, А. Г. Плетнев // Биоорганическая химия. – 1995. – Т. 21. - № 7. – С.528-534.
45. Добротворский, А. К. Динамика параметров паразитарной системы клещевого энцефалита в условиях северной лесостепи Приобья / А. К. Добротворский, В. Н. Бахвалова, Н. Н. Харитоновна, В. Ф. Сапегина // Сиб. Экол. Журнал. – 1994. – Т. 1. - №4. – С. 369 – 375.

46. Добротворский, А.К. Распределение и многолетняя динамика численности таежного клеща в северной лесостепи Приобья. Автореф. дисс...канд. биол. наук. – Новосибирск, 1992. – 21с.
47. Ефремова, Г. А. Пастбищные виды иксодовых клещей на территории Минска и оценка роли мышевидных грызунов в поддержании их численности / Г. А. Ефремова, М. М. Якович // Вест. Морд.ун-та. – 2009. - №1. - С. 82 – 83.
48. Жмаева, З. М. Методы изучения природных очагов болезней человека / З. М. Жмаева, А. А. Земская, Е. Г. Шлугер. М.: Медицина. – 1964. – С. 68 – 74.
49. Злобин, В. И. Клещевой энцефалит в Российской Федерации: этиология, эпидемиология и стратегия профилактики. Terramedicana. - 2010. - №2. - С. 13 – 21.
50. Злобин, В. И. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита / В. И. Злобин, С. И. Беликов, Ю. П. Джигоев, Т. В. Демина [и др.]. – Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН, 2003. – 271с.
51. Злобин, В. И. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита / В. И. Злобин, М. М. Верховина, Т. В. Демина, Ю. П. Джигоев [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2007. - №6. – С. 4 – 13.
52. Злобин, В. И. Молекулярные зонды для генетического типирования вируса клещевого энцефалита / В. И. Злобин, М. Х. Газо, С. И. Беликов, Т. В. Демина [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2001б. - №4. - С. 43-47.
53. Злобин, В. И. Генетическое типирование штаммов ВКЭ на основе анализа гомологии фрагмента гена белка оболочки / В. И. Злобин, Т. В. Демина, С. И. Беликов, Т. В. Бутина [и др.] // Вопросы вирусологии. 2001а. - №1. - С. 17 – 22.
54. Злобин, В. И. Анализ генетической вариабельности штаммов вируса клещевого энцефалита по первичной структуре фрагмента гена белка оболочки Е / В. И. Злобин, Т. В. Демина, Л. В. Мамаева, Т. В. Бутина [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2001б. - №1. - С. 2 – 16.

55. Зуев, В. А. Лабораторная диагностика латентных, хронических и медленных вирусных инфекций / В. А. Зуев. – М.: «Медицина», 1979. – 184с.
56. Иванова, Н. В. Роль мелких млекопитающих в очагах природных инфекций на антропогенно трансформированной территории юга-востока Западной Сибири / Н. В, Иванова //автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Томск, 2009. – 21с.
57. Иголкин, Н. И.Иксодовые клещи, их размещение, численность и эпидемиологическое значение в пойме Оби / Н. И. Иголкин, М. С. Давыдова, П. В. Семенов, В. В. Панов // Биологические ресурсы поймы Оби. – Новосибирск, 1972. – С.292-305.
58. Ильенко, В. И.Биологические варианты вируса клещевого энцефалита, вызывающие хронические формы инфекции / В. И. Ильенко, В. Г. Платонов, А. А. Смородинцев // Вопросы медицинской вирусологии. - М.: 1975. - С. 296 – 297.
59. Карань, Л. С. Генетические различия восточноевропейской и азиатской популяций вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа / Л. С. Карань, В. В. Погодина, Т. В. Фролова, А. Е. Платонов // Бюл. Сиб. Мед. – 2006. - №5.Прил. 1. – С. 24 – 27.
60. Карань, Л.С.Применение молекулярно-генетических методик для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита / Л. С. Карань, Г. В. Маленко, Н. Г. Бочкова, Л. С. Левина [и др.] // Бюллетень СО РАМН. - 2007.-№ 4(126). –С. 34-40.
61. Карасева, Е. В.Методы изучения грызунов в полевых условиях: Учеты численности и мечение / Е. В. Карасева, А. Ю. Телицина. М.: Наука, 1996. - 228с.
62. Карганова, Г. Г. Механизмы микроэволюции вируса клещевого энцефалита/ автореф. дис. ...докт. биол. наук. Москва, 2009. – 46с.
63. Карганова, Г. Г. Хозяин – специфические детерминанты в геноме вируса клещевого энцефалита / Г. Г. Карганова // Биоразнообразии и

- антропогенная трансформация природных экосистем: Материалы всероссийской научно-практической конференции, Балашов. – 2013. – С. 71 – 73.
64. Карпов, С. П. Томский очаг клещевого энцефалита и вопросы его оздоровления / С. П. Карпов // Клещевой энцефалит. - Минск, 1965 - С. – 212-221.
65. Катин, А. А. Некоторые особенности связи между показателями зараженности таежных клещей и их численности в очагах клещевого энцефалита с различной ландшафтной приуроченностью А. А. Катин, Н. Х. Якина, В. Я. Пустовалова // Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные аспекты природноочаговых болезней», посвященной 80-летию Омского НИИ природноочаговых инфекций Минздрава России. Омск, 2001. - 284с.
66. Кисленко, Г. С. О существовании функциональной связи между индексом обилия личинок и нимф переносчика вируса и величиной иммунной прослойки к возбудителю инфекции у мелких грызунов в природном очаге клещевого энцефалита / Г. С. Кисленко, Ю. С. Коротков // Зоологический журнал. - 1998. - Т. 77. - №4. - С. 504 – 506.
67. Коломин, Г. В. Млекопитающие как хозяева иксодовых клещей (Acarina, Ixodidae) // Зоол. журнал. - 2007. – Т. 86 - №4 – С. 421 – 433.
68. Колчанова, Л.П. Клещевые инфекции в ХМАО / Л.П. Колчанова, Т.Ф.Степанова, Е.А.Брагина //Материалы IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, М: РАМН. - 2007. - С.185.
69. Коренберг, Э. И. Районирование ареала клещевого энцефалита / Э. И. Коренберг, Ю. В. Ковалевский – М.:, 1981. – 148с.
70. Коренберг, Э.И. Клещевой энцефалит / Э. И. Коренберг, Д.К. Львов, С.М. Клименко, С.Я. Гайдамович // Арбовирусы и арбовирусные инфекции. – М.: Медицина, 1989. – С. 256 - 264.

71. Коротков, Ю. С. Постепенная изменчивость паразитарной системы клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. – 2005. - №3. – С. 52 – 56.
72. Коротков, Ю. С. Влияние вируса клещевого энцефалита на ход метаморфоза напивавшихся личинок и нимф клеща *Ixodes ricinus* / Ю. С. Коротков, Л. А. Буренкова // Бюл. сиб. мед. – 2006. – №5. - прил.1 – С. 36 – 41.
73. Коротков, Ю.С. Роль климатических факторов в многолетней динамике заболеваемости населения города Иркутска клещевым энцефалитом / Ю. С. Коротков, А. Я. Никитин, А. М. Антонова // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. - 2007.- Т.5.- №5.- С.10-17.
74. Кравцов, В. М. География Новосибирской области: Учебное пособие. 3-е изд., испр. и доп. / В. М. Кравцов, Р. П. Донукалова. — Новосибирск: ИНФОЛИО-пресс, 1999. – 208с.
75. Кучерук, В. В. Количественный учет важнейших теплокровных носителей болезней / В. В. Кучерук, Э. И. Коренберг // Методы изучения природных очагов болезней человека. - М. «Медицина», 1964. – С. 129 – 153.
76. Лакин, Г. Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 292с.
77. Левкович, Е. Н. Вирусы комплекса клещевого энцефалита / Е. Н. Левкович, В. В. Погодина. - Л.: Изд-во «Медицина», 1967. - 244с.
78. Леонова, Г. Н. Клещевой энцефалит в Приморском крае. – Владивосток: Дальнаука, 1997. – 190с.
79. Леонова, Г. Н. Значение дальневосточного вируса клещевого энцефалита в инфекционной патологии / Г. Н. Леонова, Н. В. Крылова, Е. В. Павленко, С. И. Беликов [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. - 2012.- №226 (1).- С 4-6.
80. Лесникова, М. В. Особенности клещевого энцефалита на территории Вологодской области / М. В. Лесникова, И. Р. Лесников, И. В. Филоненко, Н. М. Колясникова [и др.] // Труды института полиомиелита

- и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова РАМН. – 2007. – XXIV – С. 53 - 58.
81. Ливанова, Н. Н. Особенности распределения клещей *Ixodespersulcatus* и *Ixodespavlovskyi* на границе лесной и лесостепной зон Приобья / Н. Н. Ливанова, С. Г. Ливанов, В. В. Панов // Паразитология. – 2011. - №45(2). – С. 94 – 102.
82. Литвин, В. Ю. Природная очаговость болезней: развитие концепций к исходу века / В. Ю. Литвин, Э. И. Коренберг // Паразитология. – 1999. - Т.33. - №3. – С. 179 – 191.
83. Локтев, В. Б. Вирус клещевого энцефалита, генетические особенности и его изменчивость в современном мире // Бюллетень СО РАМН. – 2007. - №4. – С. 14 – 21.
84. Лукьянова, И. В. Мелкие млекопитающие – прокормители иксодовых клещей в лесостепном очаге клещевого энцефалита северо-восточного Алтая / И. В. Лукьянова, В. Ф. Сапегина // Природа очагов клещевого энцефалита на Алтае. Издательство «Наука» СО РАН, 1967. – С. 116 – 125.
85. Львов, Д. К. // Медицинская вирусология: Руководство. – М.: МИА, 2008. – 656с.
86. Ляпустин, В. Н. Изменения синтеза вирионного антигена вируса клещевого энцефалита после пассирования через иксодовых клещей и мелких млекопитающих / В. Н. Ляпустин, С. П. Чунихин, И. А. Решетников, В. А. Лашкевич // Вопросы вирусологии. – 1987. - №4. – С. 451 – 456.
87. Малькова, М. Г. Изменение границ ареалов пастбищных иксодовых клещей рода *Ixodes* на территории Западной Сибири / М. Г. Малькова, В. В. Якименко, А. К. Танцев // Паразитология. – 2012б. - №46(5). – С. 369 – 383.
88. Малькова, М. Г. Современное состояние границ ареалов пастбищных иксодовых клещей в Западной Сибири / М. Г. Малькова, В. В. Якименко,

- А. К. Танцев // Журнал инфекционной патологии. – 2012а. - №19(3). – С. 34.
89. Малькова, М. Г. Изменение границ ареалов пастбищных иксодовых клещей на территории Западной Сибири: возможные причины и последствия / М. Г. Малькова, В. В. Якименко, А. К. Танцев, В. В. Панов [и др.] // Современные аспекты природной очаговости болезней: матер. Всеросс. научно-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 90-летию ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. – Омск: ООО «Издательский центр «Омский научный вестник», 2011 – С. 55 – 56.
90. Мельникова, О. В. Зараженность голодных и питавшихся таежных клещей вирусом клещевого энцефалита (по данным иммуноферментного анализа) / О. В. Мельникова, А. Д. Ботвинкин, Г. А. Данчинова // Журнал инф. патологии. 1996. – Т. 3. - №1. – С. 14-18.
91. Мельникова, О. В. Современное состояние очага клещевого энцефалита в окрестностях Иркутска / О. В. Мельникова, Е. А. Вершинин, В. М. Корзун, Е. И. Андаев [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. - №110. – С.27 – 30.
92. Мишаева, Н. П. Влияние физиологического состояния клещей на интенсивность размножения в них вируса клещевого энцефалита / Н. П. Мишаева, В. И. Вотяков // Вопр. вирусологии.- 1978. - №2. – С. 232.
93. Морозов, Ю. В. Об участии позвоночных животных в процессе циркуляции возбудителя в очагах клещевого энцефалита: автореф. дисс. ...канд. биол. наук. - Москва, 1964. – 21с.
94. Морозова, О. В. Свойства некоторых белков вируса клещевого энцефалита: Дисс. ... доктора биол. наук. Кольцово, 2001.–216с.
95. Наумов, Н. П. Очерки сравнительной экологии мышевидных грызунов. Л.; Изд-во АН СССР, 1948. – 203с.
96. Наумов, Н.П. Роль диких позвоночных в природных очагах клещевого энцефалита // Зоологический журнал.- 1957.- Т. 36.- С. 444-452.

97. Нецкий, Г. И. К изучению фауны и ареалов иксодовых клещей Западной Сибири в связи с их ролью в природной очаговости некоторых инфекций / Г. И. Нецкий, В. И. Алифанов, И. И. Богданов, В. Г. Дарголец // Первое акарол. совещ.: тез. докл. – Л., 1966. – С. 146 – 147.
98. Окулова, Н. М. Биологические взаимосвязи в лесных экосистемах (на примере природных очагов клещевого энцефалита). - М., 1986. – 248с.
99. Орлова, В.В. Климатический очерк Барабинской низменности. - Л., Гидрометиздат, 1954. - 235с.
100. Орлова, В.В. Климат СССР. Вып. 4. Западная Сибирь. - Л., Гидрометиздат, 1962. - 360 с.
101. Павлинов, И. Я. Млекопитающие России: систематико-географический справочник / И. Я. Павлинов, А. А. Лисовский. М.: Т-во научн. Изданий КМК., 2012 - 604с.
102. Павловский, Е. Н. Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов. – Москва, Наука, 1964. – 210с.
103. Панов, В. В. Зимний период в жизни мелких млекопитающих приобских сосновых боров северной лесостепи Западной Сибири // Сиб. Экологич. Журнал. - 2001. - №6. - С. 777 – 784.
104. Панов, В. В. Мелкие млекопитающие лесопарковой зоны ННЦ – прокормители преимагинальных фаз таежного клеща. // Инфекции, передаваемые клещами в сибирском регионе. Ответственные редакторы В. В. Власов, В. Е. Репин. Новосибирск, изд-во СО РАН, 2011. - (интеграционные проекты СО РАН, вып. 30). - С. 35 – 38.
105. Песенко, Ю. А. Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях. – М.: Наука, 1982. – 287с.
106. Погодина, В. В. Эволюция клещевого энцефалита и проблемы эволюции возбудителя / В. В. Погодина, Л. С. Карань, Н. М. Колясникова, С. Г. Герасимов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2007. - №5. - С. 16-21.

107. Погодина В. В. Явление антигенной дефектности у циркулирующих в природе штаммов вируса клещевого энцефалита и его возможная связь с серонегативными формами заболевания / В. В. Погодина, Н. Г. Бочкова, Т. И. Дживанян, Л. С. Левина [и др.] // Вопросы вирусологии. - 1992. - №2. - С. 103 – 107.
108. Погодина, В. В. Сибирский и дальневосточный подтипы вируса клещевого энцефалита в европейских и азиатских регионах России: генетическая и антигенная характеристика штаммов / В. В. Погодина, Н. Г. Бочкова, Л. С. Карань, А. Г. Трухина [и др.] // Вопросы вирусологии. 2004а. - №3.- С. 20 – 25.
109. Погодина, В. В. Сравнительный анализ вирулентности сибирского и дальневосточного подтипов вируса клещевого энцефалита на основании экспериментальных и клинических данных / В. В. Погодина, Н. Г. Бочкова, Л. С. Карань, М. П. Фролова [и др.] // Вопросы вирусологии. 2004б. - №6. – С. 24 – 30.
110. Погодина, В. В. Политиповые штаммы в генофонде вируса клещевого энцефалита / В. В. Погодина, Л. С. Карань, Н. М. Калясникова, С. Г. Герасимов [и др.] // Вопросы вирусологии.– 2012- №3.- С. 30-36.
111. Погодина, В. В. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя / В. В. Погодина, Л. С. Карань, Н. М. Калясникова, Л. С. Левина [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2007.- №5.- С. 16 – 21.
112. Погодина, В. В. Хронический клещевой энцефалит / В. В. Погодина, М. П. Фролова, Б. А. Ерман. – Новосибирск: Наука, 1986. – 230с.
113. Погодина, В.В. Преобразование популяции вируса клещевого энцефалита в условиях антропогенной трансформации природных очагов / В. В. Погодина, Н. М. Калясникова // Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова. - 2008. – Т. XXV.
114. Пчелкина, А. А. Изучение вирусимии у рыжих, красных и узкочерепных полевок при экспериментальном заражении вирусом клещевого

- энцефалита / А. А. Пчелкина, Н. А. Никитина, И. Л. Кулик // Медицинская паразитология. – 1969. - №4. – С. 415 – 417.
115. Пшеничных, В. А. Экология вирусов человека и теплокровных животных / В. А. Пшеничных, П. А. Грабаев, Н. С. Гарин. – Москва, Медицина, 1977. – 271с.
116. Равкин, Ю. С. Особенности распределения мелких млекопитающих Западно-Сибирской равнины / Ю. С. Равкин, И. Н. Богомолова, Л. Н. Ермаков, В. В. Панов [и др.] // Сибирский экологический журнал. - 1996. - №3-4. - С.307 - 317.
117. Романенко, В. Н. Видовой состав клещей рода *Ixodes* в антропогенно нарушенных биотопах // Алтай: экология и природопользование. Бийск: РИОБПГУ. – 2005.- С.129 – 134.
118. Романенко, В. Н. Видовой состав и численность иксодовых клещей (PARASITIFORMES, IXODIDAE) в парках города и на окраинах // Экология, эволюция и систематика животных. Рязань: НП «Голос губернии». – 2009а. – С. 123 – 125.
119. Романенко, В. Н. Мониторинг видовой состава и численности иксодовых клещей (PARASITIFORMES, IXODIDAE) в антропогенных биотопах // Вестник Томского государственного университета. – 2009б. - №324. – С. 376 – 379.
120. Романенко, В. Н. Видовой состав иксодовых клещей на территории г. Томска / В. Н. Романенко, Н. Б. Чекалина // Вестник Томского государственного университета. Сер. Естественные науки. – 2004. - №11. Приложение. – С.132 – 134.
121. Романенко, В. Н. Зараженность иксодовых клещей, снятых с людей, вирусом клещевого энцефалита на территории г. Томска и его окрестностей / В. Н. Романенко, Л. М. Кондратьева // Паразитология. – 2011. – Т. 45, №1. – С. 3 – 10.

122. Романова, Л. Ю. Молекулярные основы изменения фенотипических характеристик вируса клещевого энцефалита при его адаптации к клещам и млекопитающим / Л. Ю. Романова, Д. В. Дживанян [и др.] // Материалы Всероссийской науч. – практ. конф. «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней». – Самара. – 2004. – С. 225 – 228.
123. Романова, Л. Ю. Изменение антигенной структуры поверхностного гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита при его адаптации к клещам и млекопитающим / Л. Ю. Романова, Л. В. Гмыль, В. Б. Локтев, Е. В. Протапопова [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2006. - №6. – С. 31 – 34.
124. Сапегина, В. Ф. К биологии *Ixodes pavlovskyi* / В. Ф. Сапегина // Тезисы докладов. V симпозиума по изучению роли перелетных птиц в распространении арбовирусов, Новосибирск, 1969. – С. 72.
125. Сапегина, В. Ф. Иксодовые клещи Северо-Восточного Алтая: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 1972. – 24с.
126. Сапегина, В.Ф. Особенности распределения *Ixodes persulcatus* в лесопарковой зоне г Новосибирска / В. Ф. Сапегина, В. И. Доронцева, В. И. Телегина, Н. Г. Ивлева [и др.] // Паразитология. - 1985. – Т.19. - № 5. – С. 370 - 373.
127. Семенов, А. В. Многообразие заражения патогенами популяции клещей *Ixodes persulatus* на территориях с сильным антропогенным прессом: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Москва, 2003. – 24с.
128. Сидорова, Е. А. Генетическое разнообразие популяции вируса клещевого энцефалита на территории национального парка «Алханай» (Забайкальский край) / Е. А. Сидорова, Л. С. Карань, Т. И. Борисова, Р. В. Адельштейн [и др.] // Сиб. мед. журн.. - 2012. -№ 4. -С.75-78.
129. Смородинцев, А. А. Клещевой энцефалит и его вакцинопрофилактика / А. А. Смородинцев, А. В. Дубов. Л.: Медицина, 1986. - 362с.

130. Субботина, Л. С. Динамика формирования иммунных комплексов, циркулирующих в крови локализованных в ткани мозга, при экспериментальном клещевом энцефалите в условиях пассивной иммунизации Л. С. Субботина, Н. А. Пеньковская, Л. В. Матюхина, Н. А. Белявская // Природноочаговые болезни человека. Омск. – 1985. – С.29 – 38.
131. Сунцова, О. В. Влияние климатических условий на экологические характеристики природных очагов клещевого борррелиоза в Прибайкалье / О. В. Сунцова, Г. А. Данчинова, Л. Б. Бадужева, М. А. Хаснатинов [и др.] // БЮЛЛЕТЕНЬ ВСНЦ СО РАМН. - 2005. - №8(46). – С.70-76.
132. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae) / ред. Н.А. Филипова. Ленинград: «Наука», 1985. – 416с.
133. Трухина, А. Г. Особенности популяции возбудителя клещевого энцефалита в зоне распространения двух серотипов вируса на территории Прибайкалья: Дис. ...канд. мед.наук. – Иркутск, 1989. – 176с.
134. Тупикова, Н. В. Методы изучения природных очагов болезней человека. М.: Медицина, 1964. – С.154 – 191.
135. Филиппова, Н. А. Иксодовые клещи подсем. Ixodinae. (В серии: Фауна СССР. Паукообразные. Т.IV, вып. 4). Л., «Наука», 1977. - 396с.
136. Формозов, А.Н. Очерки экологии мышевидных грызунов, носителей туляремии. М.: Изд-во МОИП, 1947. - 93с.
137. Хань Ши-Цзе. Клещевой энцефалит и вирусные геморрагические лихорадки / Хань Ши-Цзе, В. В. Погодина. – Омск, 1963. – 135с.
138. Ходаковский, А. И. Клещевые очаги *Ixodes persulatus* P. Sch. Таежной полосы Европейской части СССР // Паразитол. сб. Зоол. ин-та АН СССР. - 1947. - Вып. 9. - С.69 – 82.

139. Хозинская, Г. А. Изменчивость арбовирусов при репродукции в переносчиках, культурах их клеток и тканей / Г. А. Хозинская, С. П. Чунихин // Мед. паразитология. – 1988. - №3. – С.3 – 8.
140. Цилинский, Я. Я. Популяционная структура и эволюция вирусов. – М., 1988. – 63с.
141. Цибулин, С. М. Позвоночные/ С. М. Цибулин, Ю. С. Равкин, В. В. Панов, Р. В. Бабуева // Природа Академгородка: 50 лет спустя. Под ред. И. Ф. Жимулева. - Новосибирск, Изд-во СО РАН, 2007. - С.166 - 177.
142. Чабовский, В. И. Дополнения к списку хозяев таежного клеща *Ixodes persulcatus* P. Schulze // Бюллетень МОИП. -1967. - Т. 72.- №4 -С. 5-11.
143. Чаусов, Е. В. Генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и других инфекционных агентов у иксодовых клещей в городских и пригородных биотопов г. Томска. Секвенирование и молекулярно-биологический анализ генома штамма ВКЭ Глубинное/2004. Дис. ... канд. биол. наук, Кольцово, 2009. – 143с.
144. Черноусова, Н. Ф. Анализ таксономической структуры и видового разнообразия эктопаразитоценозов мелких млекопитающих в городской черте / Н. Ф. Черноусова, О. В. Толкачев, Н. П. Винадская // Зоологические исследования в регионах России и на сопредельных территориях: Материалы международной научной конференции, Саранск. – 2010. – С.228 – 231.
145. Чичерина, Г. С. Особенности инфекции вирусом клещевого энцефалита *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi* в период роста численности и трансформации видовой структуры сообщества иксодид / Г. С. Чичерина, О. В. Морозова, В. В. Панов, В. Н. Романенко [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2015. – Т. 60. – №5. – С. 42 – 46.
146. Чичерина, Г. С. Сравнительный анализ зараженности голодных иксодовых клещей *Ixodes pavlovskyi* и *Ixode spersulcatus* вирусом клещевого энцефалита в зоне симпатрии их ареалов / Г. С. Чичерина, О.

В. Морозова, В. В. Панов, В. Н. Романенко [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни – 2015. – Т. 20. – №1. – С. 20 – 26.

147. Чунихин, С. П. Экспериментальное исследование по экологии вируса клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии, 1990.- №3.- С.183-188.
148. Чунихин, С. П. Экология и географическое распространение арбовирусов. АМН СССР / С. П. Чунихин, Г. Н. Леонова. – М.: Медицина, 1985. - 128с.
149. Чунихин, С. П. Половая передача вируса клещевого энцефалита у иксодовых клещей (Ixodidae) / С. П. Чунихин, Л. Ф. Стефуткина, М. Б. Королев, И. А. Решетникова [и др.] // Паразитология. – 1983. – Т. 17. – Вып. 3. – С.214-217.
150. Шилова, С. А. О возможности прогнозирования заболеваемости клещевым энцефалитом // Тезисы докладов межобластной научно-практической конференции по природно-очаговым инфекциям. – Тюмень, 1961. – С.142-144.
151. Щучинова, Л.Д. Распространенность клещевых микст-инфекций в Горном Алтае // Вестник российской военно-медицинской академии. - 2008. - №2(22).- Приложение, часть 2. - С.592-593.
152. Юдин, Б. С. Насекомоядные млекопитающие Сибири. – Новосибирск: Наука, 1989. – 360с.
153. Якименко, В. В. Иксодовые клещи Западной Сибири: Фауна, экология, основные методы исследования / В. В. Якименко, М. Г. Малькова, С. Н. Шпынов. – Омск: ООО ИЦ «Омский научный вестник». – 2013. – 240с.
154. Ясюкевич, В. В. Потенциальные изменения ареалов клещей *Ixodes ricinus* и *Ixodes persulcatus* (Parasitiformes, Ixodidae) на территории России и других странах СНГ в связи с наблюдаемыми на протяжении XX века изменениями климата / В. В. Ясюкевич, Е. В. Казакова, Е. А. Давидович // Труды Ставропольского отделения Русского энтомологического общества. Ставрополь. – 2009. – С.299 – 304.

155. Alekseev, A. N. Ecology of tick-borne encephalitis virus: part of Ixodidae ticks males in its circulation // *Ecological Parasitol.* (Leningrad, Petrozavodsk). – 1992. – Vol.1. – №1. – P. 48 – 58.
156. Allison, S. L. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH / S. L.Allison, J.Schalich, K.Stiasny, C. W.Mandl [et al.] // *J. Virol.* - 1995. – V. 69. – №2. – P.695 – 700.
157. Bakhvalova V.N., Panov V.V., Morozova O.V. Tick-borne encephalitis virus quasispecies rearrangements in ticks and mammals / V.N. Bakhvalova, V.V. Panov, O.V . Morozova // Daniel Ruzek., eds. *Flavivirus encephalitis.* – 2011. P. 213-234.
158. Bakhvalova, V.N. Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of Western Siberia, Russia / V.N. Bakhvalova, A. K. Dobrotvorsky, V.V. Panov, V. A. Matveeva [et al.] // *Vector Borne Zoonotic Dis.* -2006.-№ 6(1).-P.32 – 41.
159. Brmane, A. Vectors of tick-borne diseases and epidemiological situation in Latvia in 1993-2002 / A. Brmane, I. Lucenko, A. Duks, V. Matchoutko [et al.] // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2004. – V. 293(37) – P.36-47.
160. Casati, S. Diversity of the population of tick-borne encephalitis virus infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern) / S. Casati, L. Gern, J-C. Pifaretti // *J. Gen. Virol.* – 2006. – V.87 – P. 2235 – 2241.
161. Castle, E. Nucleotide sequence of the 5'-terminal untranslated part of the genome of the flavivirus West Nile virus / E. Castle, G. Wengler // *Arch. Virol.* – 1987 – V.92 – №2 – 3 – P.309 – 313.
162. Chomczynski, Piotr. Single-Step Method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction / Piotr Chomczynski, Nicoletta Sacchi // *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* – 1987. –V.162. – P. 156–159.

163. Clark, D. H. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses / D. H. Clark, J. Casals // *Amer.J. trop. Med. Hyg.* – 1958. – V.7. - №5. – P.561-573.
164. Ecker, M. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia /M. Ecker, S.L. Allison, T. Meixner, F.X. Heinz // *J. Gen. Virol.* – 1999. – V.80. – P.179 – 185.
165. Gritsun, T.S. Tick-borne encephalitis / T.S. Gritsun, V.A. Lashkevich, E.A. Gould // *Antiviral Res.* - 2003. – V. 57. – P.129–146.
166. Guirakhoo, F. The MurrayValley encephalitis virus prM conferens acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within R2 domain of E glycoprotein / F. Guirakhoo, R. A. Bolin, J. T. Roehring // *Virology.* - 1992. – V.191. - №2. – P.921-931.
167. Hayasaka, D. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis from Japan and Far-Eastern Russia / D. Hayasaka, Y. Suzuki, H. Karima // *J. Gen. Virol.* - 1999. - V. 80. – P.3127 – 3135.
168. Heins, F. X. Family Flaviviridae / F. X. Heins, M. S. Collett, R. H. Purcell, E. A. Gould [et al.] // *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International committee on Taxonomy of Viruses* . Eds. M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop et al. – San Diego: Academic press. – 1999 – P.858-878.
169. Helenius, A. Alphavirus and flavivirus glycoproteins: structures and functions// *Cell.* - 1995. – V. 81. - №5. – P.651-653.
170. Holzmann, H. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes/ H. Holzmann, M.S. Vorobyova, I.P. Ladyzhenskaya, E. Ferenczi. [et al.]// *Vaccine.* – 1992. - V. 10. - № 5 – P. 345-349.
171. Jones, L. D. A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host / L. D. Jones, C. R. Davies, G. M. Steele, P. A. Nutall // *Science.* – 1987. V. 237.-№ 4816. – P.775 – 777.

172. Kovalev, S. Y. Clusteron structure of tickborne encephalitis virus populations / S. Y. Kovalev, T. A. Mukhacheva // *Infect Genet Evol.* – 2013. - №14. - P.22 – 28.
173. Labuda, M. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between co-feeding ticks / M. Labuda, L.D. Jones, T. Williams, V. Danielova [et al.] // *J. Med. Entomol.* - 1993. - V. 30/ - № 1. - P.295-299.
174. Liu, L. Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition / L.Liu, H. Dong, H. Chen, J.Zhang [et al.] // *Front Biol.* - 2010. - V. 5,. - № 4. - P.286–303.
175. Mandl, C.W. Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses / C.W. Mandl, F.X. Heinz, C. Kunz // *Virology.* - 1988. - V. 166. - P.197-205.
176. Norberg, P. Genetic recombination of tick-borne flaviviruses among wild-type strains / P. Norberg, A. Roth, T. Bergström // *Virology.* - 2013 - 440(2) - P.105-116.
177. Nuttal, H. A. Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface / H. A. Nuttal, M. Labuda // *Advances in Virus Research.* – 2003. – V. 60. – P.233 – 272.
178. Randolph, S. E. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* - 2001. – V. 356 (1411). - P.1045 – 1056.
179. Randolph, S. E. Tick-borne disease systems emerge from the shadows: The beauty lies in molecular detail, the message in epidemiology // *Parasitology.* – 2009. – 136. - № 12. – P.1403 – 1413.
180. Randolph, V. B., Winkler G., Stollar V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein / V. B. Randolph, G. Winkler, V. Stollar // *Virology.* - 1990. – V.174. - №2. – P.450-458.
181. Reed, L. A simple method of estimating fifty per cent endpoints / L. Reed, H. Muench // *Amer. J. Hyg.* – 1938. – № 27. – P.439 – 497.

182. Rice C.M., Structure of the flavivirus genome /C.M. Rice, E.G. Strauss, J.H. Strauss //The Togaviridae and Flaviviridae(S. Schlesinger, M.R. Schlesinger/ Eds.). Plenum Press., New York-London. – 1986. – P.279-326.
183. Romanova, L.Iu. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation /L.Iu.Romanova, A.P.Gmyl, T.I.Dzhivianian, D.V. Bakhmutov [et al.] //Virology. – 2007. – V.362(1). – P.75-84.
184. Sonenshine, DE. Biology of ticks. Oxford University Press. - 1991. – V.1. – 472p.
185. Suss, J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines// Vaccine. – 2004. – 21 – P.119-135.
186. Takashima, I.Epidemiology of tick-Borne encephalitis (TBE) and philogenetic analisis of TBE viruses in Japan and Fer Eastern Russia / I. Takashima, D. Hayasaka, A. Goto //J. Infect. Dis. – 2001. – V.54 – P.1 – 11.
187. Wallner G., Mandl C.W., Kunz C., Heinz F.X. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus / G. Wallner, C.W. Mandl, C. Kunz, F.X. Heinz // Virology. - 1995. – V. 213. - №1. – P.169-178.
188. Wecker, E. The exctraction of infectious virus nucleic acid with hot phenol//Virology. - 1959. - №7. – P. 241-243.
189. Wengler, G.Cell-associatrd West Nile flavivirus is covered with E+prM protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release /G.Wengler , G.Wengler // J. Virol., 1989. – V. 63. - №6. – P.2521-2526.
190. White, J. Viral and cellular membrane fusion proteins // Annu. Rev. Physiol.. - 1990. – V.52. – P.675-697.