

Дима Ф., 3 г. 6 мес., заболел 2 июня с появления слабости, головной боли, болях в мышцах шеи и конечностей. Температура тела повысилась до 39,6°C, появился озноб. На 2-ой день заболевания при подъеме температуры до 40°C возник фокальный эпилептический припадок в левой верхней конечности. Судорожные припадки большие не повторялись, сохранялось дрожание в левой руке и спутанность сознания. Перестал глотать, голос приобрел гнусавый оттенок.

При поступлении на 3 день болезни контакту недоступен, сознание – сопор, стонет, на осмотр реагирует монотонным криком. Лицо гиперемировано с гримасой боли. Зрачки расширены. Кожные покровы горячие на ощупь, был покрыт липким потом, отмечалась гиперсаливация. Общая гиперестезия. Менингеальные симптомы положительные: ригидность затылочных мышц 3 поперечных пальца, симптом Кернига 110° с обеих сторон, положительный симптом Брудзинского верхний. Левый угол рта опущен, левосторонний птоз. Мышечный тонус в конечностях снижен.

За время наблюдения температура тела держалась на субфебрильных цифрах. Стал вступать в контакт, восстановился голос и глотание. Начал подниматься с кровати. На 12-е сутки от начала заболевания состояние мальчика резко ухудшилось. Появилась резкая головная боль, многократная рвота, наросли менингеальные симптомы на фоне подъема температуры тела до 40,5°C. Нарушилась речь и глотание, усилился тремор в левой верхней конечности. На 17-е сутки развились генерализованные тонико-клонические судороги, развилась кома. На фоне активной дегидратационной, противосудорожной терапии в состоянии ребенка появилось улучшение к 19-му дню болезни. Менингеальные симптомы купировались, ребенок пришел в сознание, появились активные движения в дистальных отделах конечностей. Уменьшился левосторонний птоз. В последующие дни состояние мальчика улучшалось. На 21-е сутки уменьшилась атаксия, появились активные движения в правых конечностях, но в левых сохранялась мышечная слабость, значительное ограничение движений в левой руке, нарастала атрофия мышц.

Клинический диагноз: Клещевой энцефалит, острая стадия, полиоэнцефаломиелитическая форма, двухволновая тяжелая форма, тетрапарез с преимущественным поражением левых конечностей. Бульбарный синдром.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Жукова Н.Г., Лепехин А.В., Лукашева Л.В. и др. Современные клинические проявления клещевого энцефалита в Томской области // Бюллетень Сибирской медицины. – 2006. – Т. 5. Прил. 1. – С.52-56.
2. Захарычева Т.А., Воронкова Г.М., Мжельская Т.В. Дальневосточный клещевой энцефалит: течение и исходы в современных условиях // Вестник Уральской государственной медицинской академии. – 2010. – Вып. 21. – С.83-85.
3. Команденко Н.И., Жукова Н.Г. Некоторые дискуссион-

ные вопросы проблемы клещевого энцефалита // Бюллетень Сибирской медицины. – 2006. – Т. 5. Прил. 1. – С.57-62.

В динамике к концу недели в 32,3% случаев отмечалось уменьшение выраженности симптомов интоксикации, менингеальные симптомы купировались в 29,0% наблюдений от общего числа. Сохранялась рассеянная очаговая симптоматика в виде пареза мимической мускулатуры, девиации языка в 32,3% случаев, гемипарезы – в 22,6%. В 67,7% наблюдений температура сохранялась на фебрильных значениях, все больные жаловались на резкую головную боль, выраженную слабость, плохой аппетит, сонливость. Летальным исходом завершился 1 (3,2%) случай заболевания (менингоэнцефалитическая форма клещевого энцефалита). Иммунологическое исследование, проведенное в острый период, зафиксировало резкое повышение уровня сывороточного ИФН $\gamma$  у больных с очаговыми формами клещевого энцефалита (354,1 $\pm$ 24,8 пг/мл против 75 $\pm$ 4,1 пг/мл в контроле,  $p < 0,001$ ). При сравнении в динамике среднее количество ИФН $\gamma$  снижалось, составив 257,5 $\pm$ 32,1 пг/мл, но по-прежнему превышало контрольные значения ( $p < 0,05$ ). Концентрация ИЛ-1 $\alpha$  в сыворотке крови у больных с очаговыми формами КЭ превышала контрольные значения в 10,4 раза, составив 366,3 $\pm$ 31,9 пг/мл, ( $p < 0,01$ ). В динамике уровень системного ИЛ-1 $\alpha$  имел тенденцию к повышению в периоде реконвалесценции до 422,2 $\pm$ 29,2 пг/мл, ( $p < 0,001$ ), что в клинической картине соответствовало сохранению лихорадки и очаговой симптоматики. При анализе содержания сывороточного ИЛ-10 у больных клещевым энцефалитом с очаговой формой заболевания концентрация повышалась, составляя 167,7 $\pm$ 25,5 пг/мл, (14,6 $\pm$ 1,8 пг/мл – у здоровых,  $p < 0,05$ ). При повторном исследовании у больных с очаговой формой КЭ концентрация ИЛ-10 снижалась до 63,5 $\pm$ 26,2 пг/мл.

Таким образом, очаговые формы клещевого энцефалита отличались крайне тяжелой симптоматикой, с выраженными общетоксическими и общемозговыми симптомами, тяжелыми поражениями нервной системы с развитием судорог, потери сознания, периферических вялых параличей, гемипарезов спастического характера, появление патологических стопных знаков, развития косоглазия, птоза, бульбарного синдрома, вплоть до летального исхода (1 ребенок). У детей с КЭ в острый период установлена однонаправленность изменений системного цитокинового статуса: гиперпродукция ИФН $\gamma$  и ИЛ-10. В динамике заболевания – активное снижение уровня ИЛ-10, что вероятно свидетельствует о развитии Th1/Th2 типа иммунного ответа.

ные вопросы проблемы клещевого энцефалита // Бюллетень Сибирской медицины. – 2006. – Т. 5. Прил. 1. – С.57-62.

4. Овчинникова А.А., Гуляева С.Е., Гуляев С.А. и др. Клещевой энцефалит на Дальнем Востоке: аспекты эпидемиологии // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – №1. – С.107-109.
5. Laursen K., Knudsen J.D. Tick-borne encephalitis: a retrospective study of clinical cases in Bornholm, Denmark // Scand. J. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 35. №5. – P.354-357.

**Информация об авторах:** Черникова Анастасия Анатольевна – к.м.н., ассистент, 690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2, тел. (423)2325569, e-mail: tais359t@mail.ru; Гордеец Альвина Васильевна – д.м.н., профессор кафедры, тел./факс (423) 2229789, e-mail: all-39@mail.ru; Шаркова Валентина Александровна – д.м.н., заведующий кафедрой, тел. (423)2429822, e-mail: vailexsh@mail.ru; Хегай Татьяна Сергеевна – студентка 6-го курса лечебного факультета, e-mail: femina@mail.ru.

© КОЗЛОВА И.В., ВЕРХОЗИНА М.М., ДЕМИНА Т.В., ДЖИОЕВ Ю.П., ТКАЧЕВ С.Е., КАРАНЬ Л.С., ДОРОЩЕНКО Е.К., ЛИСАК О.В., СУНЦОВА О.В., ПАРАМОНОВ А.И., ЧЕРНОИВАНОВА О.О., РЕВИЗОР А.О., ЗЛОБИН В.И. – 2012  
УДК: 578.2'21: 578.4

#### КОМПЛЕКСНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОРИГИНАЛЬНОЙ ГРУППЫ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

Ирина Валерьевна Козлова<sup>1,3</sup>, Марина Михайловна Верховзина<sup>2</sup>, Татьяна Васильевна Демина<sup>3</sup>,

Юрий Павлович Джигоев<sup>1</sup>, Сергей Евгеньевич Ткачев<sup>4</sup>, Людмила Станиславовна Карань<sup>5</sup>,  
Елена Константиновна Дорощенко<sup>1</sup>, Оксана Васильевна Лисак<sup>1</sup>, Ольга Владимировна Сунцова<sup>1</sup>,  
Алексей Игоревич Парамонов<sup>1</sup>, Ольга Олеговна Черноиванова<sup>1</sup>, Александр Олегович Ревизор<sup>3</sup>,  
Владимир Игоревич Злобин<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН, Иркутск, директор – член-корр. РАМН, проф., д.м.н. Л.И. Колесникова; <sup>2</sup>Центр эпидемиологии и гигиены в Иркутской области, руководитель – к.м.н. И.В. Безгодов; <sup>3</sup>Иркутский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. И.В. Малов; <sup>4</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, директор – акад. РАН В.В. Власов; <sup>5</sup>Центральный НИИ эпидемиологии, Москва, директор – акад. РАМН, д.м.н., проф. В.И. Покровский)

**Резюме.** Получены новые данные об оригинальном варианте вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), циркулирующем на территории Восточной Сибири. Выявлена группа из 13 штаммов, имеющих генетическую структуру, аналогичную штамму 886-84. Дифференцирующий уровень генетических отличий от других генотипов (более 12%), наличие собственного ареала, экологическая связь со всеми звеньями трансмиссивной цепи, участие в патологии человека, стабильность и длительность циркуляции в природе подтверждают правомерность аттестации «группы 886» в качестве самостоятельного генотипа 5 ВКЭ. Показано, что среди представителей этой группы имеются штаммы, обладающие свойствами, соответствующими основным критериям, используемым при первоначальном отборе штаммов на роль кандидатов для приготовления диагностических и вакцинных препаратов.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, генетические свойства, биологические свойства, генотип.

### COMPREHENSIVE DESCRIPTION OF THE ORIGINAL GROUP OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS STRAINS ISOLATED ON THE TERRITORY OF EASTERN SIBERIA

I.V. Kozlova<sup>1,3</sup>, M.M. Verhozina<sup>2</sup>, T.V. Demina<sup>3</sup>, Yu.P. Dzhiyoev<sup>1</sup>, S.E. Tkachev<sup>4</sup>, L.S. Karan<sup>5</sup>, E.K. Doroshenko<sup>1</sup>,  
O.V. Lisak<sup>1</sup>, O.V. Suntsova<sup>1</sup>, A.I. Paramonov<sup>1</sup>, O.O. Chernovanova<sup>1</sup>, A.O. Revizor<sup>3</sup>, V.I. Zlobin<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>The Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction of SD RAMS, Irkutsk; <sup>2</sup>Center for Epidemiology and Hygiene in the Irkutsk region; <sup>3</sup>Irkutsk State Medical University; <sup>4</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk; <sup>5</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Moscow)

**Summary.** The new data has been obtained on original kind of tick-borne encephalitis virus (TBEV) circulating in Eastern Siberia. We revealed a group of 13 strains having a genetic structure analogous to strain 886-84. The differentiation level of genetic differences from other genotypes more than 12%, own areal, ecological relationship with all the links of a vector-borne chain, participation in human pathology, the stability and duration of circulation in nature confirms the validity of certification of “group 886” as a separate TBEV genotype 5. It has been shown that among the representatives of genotype 5 of TBEV there are strains which meet the basic criteria used in the initial selection of candidates for the role of strains for the preparation of diagnostic and vaccinal preparations.

**Key words:** genetic properties, biological properties, genotype.

При исследовании этиологической структуры клещевого энцефалита в Восточной Сибири нами установлена циркуляция вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) трех генотипов, при общем доминировании генотипа 3. Кроме того, были обнаружены уникальные штаммы (886-84 и 178-79), обладающие генетической структурой, существенно отличающейся от трех основных генотипов ВКЭ [7].

В настоящее время с помощью метода молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот с генотипспецифическими зондами (МГНК), секвенирования полного генома ВКЭ и его фрагментов нами выявлена группа из 13 штаммов, гомологичных штамму 886-84, которую мы условно обозначили как «группа 886» [4]. Результаты наших исследований свидетельствуют в пользу того, что этой группе штаммов должен быть присвоен статус самостоятельного генотипа.

Оригинальная генетическая структура штаммов «группы 886» выражается в своеобразной фенотипической характеристике, изучение которой представляет значительный научный интерес. Кроме того, учитывая уникальность генетических и антигенных свойств штаммов «группы 886», они, возможно, могут рассматриваться как кандидаты для создания универсальных, эффективных в отношении различных серотипов (генотипов) ВКЭ диагностикумов и вакцин, проблема создания которых до сих пор остается актуальной.

Цель исследования: изучение генетических и биологических свойств

штаммов ВКЭ «группы 886», циркулирующих на территории Восточной Сибири, оценка их патогенного потенциала, исследование штаммов по комплексу критериев, учитываемых при отборе штаммов-кандидатов в диагностические и вакцинные препараты.

### Материалы и методы

**Вирус КЭ.** В работе использовано 13 штаммов ВКЭ из коллекции Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН, отнесенных по результатам генотипирования с помощью МГНК или секвенирования полного генома ВКЭ и его фрагментов к «группе 886». Сведения об этих штаммах приведены в таблице 1.

Таблица 1  
Сведения о штаммах «группы 886» ВКЭ, изолированных на территории Восточной Сибири

№ штамма	Год изоляции	Источник изоляции	Место сбора материала
886-84	1984	<i>Myodes rutilus</i>	Иркутская область, Эхирит-Булагатский район
711-84	1984	<i>Myodes rufocanus</i>	Республика Бурятия, Баргузинский район
740-84	1984	<i>Myodes rufocanus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
712-89	1989	<i>I. persulcatus</i>	Забайкальский край, Красночикоийский район
780-89	1989	<i>I. persulcatus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
617-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
636-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
608-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
606-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
691-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Республика Бурятия, Бичурский район
418-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Забайкальский край, Красночикоийский район
733-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Забайкальский край, Красночикоийский район
742-90	1990	<i>I. persulcatus</i>	Забайкальский край, Красночикоийский район

**Генотипирование штаммов.** Для получения генетической характеристики штаммов использовали МГНК с 3 панелями в составе 40 дезоксирибонуклеотидных зондов, комплементарных участкам 10 генов различных генотипов ВКЭ [4].

Выделение суммарной РНК из мозга инфицированных мышей или культур клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ), нанесение ее на нитроцеллюлозные или капроновые фильтры, гибридизация с дезоксирибонуклеотидными зондами осуществляли по общепринятой методике [10].

Аmplификацию осуществляли с праймерами, соответствующими фрагментам 5'-некодирующей области и генам С-ргМ-Е-NS1, либо фрагменту гена Е, либо фрагментам генов Е и NS1, синтезированными в Институте ХБ и ФМ СО РАН (Новосибирск). Одно- и двухраундовую ПЦР проводили с использованием данных олигонуклеотидов в качестве праймеров, в соответствии с рекомендациями производителя («Биосан», Новосибирск).

Определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР проводили в Центре секвенирования ДНК СО РАН, г. Новосибирск. Анализ полученных последовательностей осуществляли с помощью программы Mega 5.0 [19]. Для сравнения использовали последовательности фрагментов генома штаммов ВКЭ, относящихся к различным генетическим типам, из базы данных GenBank. Поиск гомологии полученных нуклеотидных последовательностей с уже известными последовательностями фрагментов геномов ВКЭ проводили с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Нуклеотидные последовательности штаммов «группы 886», полученные в ходе исследования, депонированы в международную электронную базу данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>), номера доступа №EF469662, EU878281-EU878283, JN936341, JN936347, JN936349-JN936350, JN936353- JN936355.

Определение нуклеотидных последовательностей генома штамма 886-84 и фрагментов генома штаммов 606-90 и 608-90 проведено Карань Л.С. и соавт. на базе ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.

**Иммунотипирование штаммов.** Реакцию диффузной преципитации в агаре (РДПА) ставили по методу Д. Кларк [9] с модификациями С.Г. Рубина [18] и Н.Г. Бочковой [2].

**Изучение цитопатической активности** проводили по общепринятым методикам. Титры вируса в опытах титрования на культуре клеток СПЭВ определяли по цитопатическому действию (ЦПД) по методу полных кумулятивов Рида и Менча и выражали в lg ТЦД50/мл [17].

**Нейроинвазивность.** Для оценки нейроинвазивности определяли индекс инвазивности (И) – разницу титров вируса при интрацеребральном (mNic) и подкожном (mNsc) заражении мышей, выраженную в lg LD50/мл [12]. Титры вируса определяли по методу Рида и Менча. Значение И в пределах 1-2,5 свидетельствовало о высоких инвазивных свойствах штамма. Значение  $I \geq 3$  указывало на сниженную инвазивную активность штамма.

Работы с лабораторными животными проводились в соответствии с моральными и этическими требованиями к биомедицинским исследованиям с использованием лабораторных животных.

Терморезистентность (Т50) штаммов ВКЭ изучали по методу Э.А. Овчинниковой и др. [11]. Уровень терморезистентности оценивали по индексу инактивации – разнице lg титров прогретого при 50°C в течение 15 мин. и непрогретого (4°C) вируса. При разнице титров  $\leq 2,0$  lg штамм оценивали как  $T^{50+}$ , от 2,1 до 3,0 lg – как промежуточный,  $\geq 3,1$  lg – как  $T^{50-}$ .

**Rct<sub>42</sub>-признак** (способность вируса к репродукции при супраоптимальной температуре). Признак rct42 оценивали по разнице lg титров вируса при культивировании штаммов на культуре клеток СПЭВ при темпе-

ратуре 37°C и 42°C. При разнице титров  $\leq 2,0$  lg штамм оценивали как rct<sub>42+</sub>, от 2,1 до 3,0 lg – как промежуточный,  $\geq 3,1$  lg – как rct<sub>42-</sub>.

**S-признак.** Культуру клеток СПЭВ заражали штаммами ВКЭ, прошедшими не более 4-х пассажей через мозг белых мышей и трехкратное клонирование. Бляшки появлялись на 3-4-е сутки. S-признак учитывался как S<sup>+</sup> при диаметре бляшки (d)  $\geq 2,5$  мм; S<sup>±</sup> – при 2,5>d  $\geq 2,0$ ; S<sup>-</sup> – при 2,0>d  $\geq 1,0$ .

## Результаты и обсуждение

Впервые необычность штамма 886-84 ВКЭ была выявлена при изучении его серологических свойств [14]. В дальнейшем штамм 886-84 был описан нами как представитель самостоятельного генотипа, в соответствии с критериями, выведенными нами на основе сравнения уровня отличий фрагмента гена Е (нуклеотидные позиции 567-727) у 29 штаммов ВКЭ, изолированных в различных частях ареала [5]. Оказалось, что при анализе гомологии аминокислотных последовательностей соответствующего фрагмента белка Е длиной 53 а.о., штамм 886-84 примыкает к генотипу 3. Он имеет в позиции 206 лейцин, как и все штаммы этого генотипа, а в позиции 234 аминокислоту аспарагин, как и генотипы 1 и 2 [7]. Исходя из этого, а также по причине того, что гомологичные ему изоляты на тот момент не были обнаружены, мы посчитали, что для выделения этого штамма вируса в отдельный генотип необходимо получение дополнительных данных.

Сопоставление полного генома штамма 886-84 (EF469662) с последовательностями ВКЭ, имеющимися в GenBank, показало, что на филогенетических деревьях он образует самостоятельную ветвь, не входя в состав кластеров трех основных генотипов (рис. 1), и по уровню нуклеотидных и аминокислотных замен также «приближается к границе разделения генотипов» [8] (табл. 2).

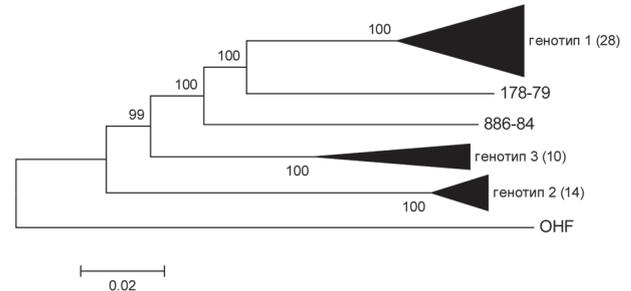


Рис. 1. Филогенетическое древо, демонстрирующее уровень генетического родства 54 штаммов ВКЭ, полученное на основании расшифровки кодирующей области полипротеина (10242 н.п.). Состав кластеров: генотип 1 - Sofjin [16] X07755, AV022703, AV001026, DQ989336, AY182009, AY217093, JF316707, JF316708, FJ997899, EU816450-EU816455, AY169390, FJ906622, GQ228395, FJ402885, FJ402886, DQ862460, GU121642, HQ201303, HQ901367, HQ901366, HM859894, HM859895, JN003205; генотип 2 - TEU27495, TEU27491, TEU39292, AF091010, EU106868, DQ401140, GV266392, HM535610, HM535611, HM120875, GU183379- GU183381, GU183383; генотип 3 - L40361, AF527415, DQ486861, FJ968751, JN003206- JN003209, GU183382, GU183384.

Анализ полной аминокислотной последовательности генома штамма 886-84 подтвердил, что его генетическая структура уникальна, она представляет собой «переплетение» из последовательностей, характерных для генотипов 1, 2 и 3. Например, в наборе из 22 позиций, однозначно дифференцирующих известные штаммы ВКЭ на три основных генотипа, для штамма 886-84 обнаружено чередование собственных (или уникальных) аминокислот (аланин (А) в позиции С-108, серин (S) – NS2А-127 и глицин (G) – NS3-258) с аминокислотами, характерными для каждого из основных генотипов (рис. 2).

Таблица 2

Уровень нуклеотидных и аминокислотных замен между генотипами ВКЭ и штаммом 886-84 (%) (кодирующая область полипротеина, длина 10242 н.о.)

Уровень нуклеотидных замен (%) (кодирующая область полипротеина, длина 10242 н.о.)			
	генотип 1	генотип 2	генотип 3
генотип 1	4,3		
генотип 2	16,4	2,3	
генотип 3	14,4	15,2	5,4
886-84	12,5	15,6	13,7
Уровень аминокислотных замен (%) (полная аминокислотная последовательность полипротеина, длина 3414 а.о.)			
	генотип 1	генотип 2	генотип 3
генотип 1	1,3		
генотип 2	6,9	0,9	
генотип 3	5,3	6,2	1,9
886-84	3,9	6,0	4,2

Примечание: серым цветом выделен уровень нуклеотидных и аминокислот замен внутри генотипа.

На настоящий момент с помощью МГНК и секвенирования нами выявлена группа из 13 изолятов, имеющих генетическую структуру, аналогичную штамму

белок	С		Е		NS1			NS2A					NS3			NS4B			NS5			
№ а.о. по белку	3	108	206	317	54	141	285	100	127	174	175	225	126	258	376	21	28	96	18	297	671	832
Генотип 1	G	V/L/I	S	I/T	T	S/G	R	N	A	M/v	L	I/v	I	V	I/t	H	E	A/R	G	R	V/g	A/v/T
Генотип 2	K	I	V	A	S	Q	T	S	D/e	V	C	A	L/l	A	A	R/Q	S	T	N	E/a	L	M
Генотип 3	R	T	L	T	N	G	K	G/S	G	I/v	I/f	T	M/t	M/v/A	V	Q	G	S	S	G/R	I	T/a
886-84	R	A	L	I	N	S	K	S	S	M	L	A	I	G	V	Q	G	A	S	G	V	A

Примечание. Каждый оттенок серого цвета в ячейке указывает на соответствие аминокислотного остатка одному из четырех генотипов ВКЭ. Черный цвет ячейки означает, что аминокислота характерна только для штамма 886-84.

Рис. 2. Отличия между штаммами вируса клещевого энцефалита разных генотипов в 22 позициях, выявленные путем сопоставления 54 полипротеиновых структур.

886-84. Для восьми штаммов из этой группы были получены фрагменты геномов длиной 1650 н.о., кодирующие белки С, М и часть белка Е (810 н.о.) (GenBank, №№ доступа: EF469662, EU878281-EU878283, JN936341, JN936347, JN936349-JN936350, JN936353-JN936355) (рис. 3). Гомология со штаммом 886-84 составила 98,2-99,8%, а уровень различий между штаммами «группы 886» и представителями трех основных генотипов варьировал от 13,1% со штаммом *Софьин* до 16,6% со штаммом *Найдорф*.

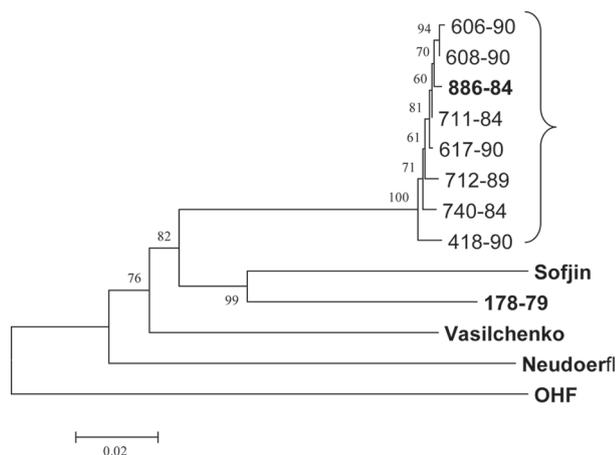


Рис. 3. Филогенетическое дерево (NJ, Kimura 2), построенное на основе анализа фрагмента генома ВКЭ, соответствующего генам С, М и части Е (1650 н.о.).

Проведенные нами исследования позволили установить, что ВКЭ «группы 886» имеет собственный ареал. Штаммы, входящие в состав данного варианта ВКЭ, были выделены из материала, собранного на территории Республики Бурятия, Иркутской области

и Забайкальского края. Об изоляции двух штаммов «группы 886» из клещей *I. persulcatus* (1999 г.) и одного из *Myodes rutilus* (2010 г.), отловленных на территории Национального парка «Алханай» Дудьдургинского района Забайкальского края сообщил Е.И. Андаев и соавт. [1]. Недавно в литературе описан случай менингоэнцефалита с летальным исходом в Булганском аймаке Монголии, который был вызван изолятом, имеющим генетическую структуру, аналогичную штамму 886-84 [15]. Общей особенностью вышеперечисленных территорий является то, что на каждой из них отмечается совмещение нескольких ландшафтных формаций, что обеспечивает большое разнообразие флоры и фауны.

Нами получены данные об экологической связи штаммов «группы 886» со всеми звеньями трансмиссивной цепи. Так, штаммы 712-89, 418-90, 606-90, 608-90, 617-90, 636-90, 691-90, 733-90 и 742-90 изолированы от клещей *I. persulcatus*, штаммы 711-84 и 740-84 – из мозга красно-серой полевки, штамм 886-84 – из мозга красной полевки.

Описанный в литературе летальный случай менингоэнцефалита в Монголии, вызванный штаммом, гомологичным штамму 886-84, свидетельствует в пользу

возможного участия данного варианта ВКЭ в инфекционной патологии человека, а изоляция штаммов «группы 886» на протяжении длительного периода времени (с 1983 по 2010 гг.) подтверждает стабильность его циркуляции на территории Восточной Сибири. Таким образом, штаммы «группы 886» обладают всеми необходимыми характеристиками для их

выделения в самостоятельный генотип ВКЭ. Ранее мы предположили, что два штамма 178-79 и 886-84, не вошедшие в состав трех основных генотипов ВКЭ и образовавших собственные ветви на филогенетическом древе, могут являться представителями генотипов 4 и 5 [5,6]. Представленные данные являются подтверждением и развитием данной гипотезы, и позволяют выделить в качестве нового генотипа 5 штаммы, обладающие комплексом свойств, присущих описанному в данной работе штаммам «группы 886» ВКЭ.

Наряду с установлением оригинальной генетической структуры штаммов «группы 886» мы сочли необходимым оценить их фенотипические характеристики, которые являются важной составляющей полноценного представления о природе и свойствах вируса, и имеют большое значение для практической вирусологии.

Оценку степени вирулентности штаммов ВКЭ «группы 886» проводили по двум показателям: среднему инфекционному титру при заражении молодых белых мышей в мозг и при периферическом введении. Периферическую активность характеризовали индексом инвазивности (И). Титры вируса при мозговом заражении мышей варьировали от 6,64 до 10,9 lgLD<sub>50</sub>/мл, а при периферическом введении – от 3,8 до 9,8 lgLD<sub>50</sub>/мл. Индексы инвазивности находились на уровне высоких и средних значений (от 0,8 до 3,04 lgLD<sub>50</sub>/мл). Шесть штаммов из «группы 886» обладали высокими инвазивными свойствами, что свидетельствует об их способности преодолевать гематоэнцефалический барьер, достигать ЦНС и размножаться в ней. Наибольшими инвазивными свойствами обладали штаммы, изолированные от грызунов, а также штамм 712-89, изолированный от клещей из Красночуйского района Забайкальского края. Два штамма (606-90 и 608-90) из Бичурского района Республики Бурятия обладали низкой нейроинвазивной активностью.

Недавно в научной литературе появилось сообще-

ние о случае менингоэнцефалита с летальным исходом в Монголии, вызванного изолятом ВКЭ, уровень гомологии которого со штаммом 886-84 составил 98,5%. Заражение данного человека произошло на территории Булганского аймака, примыкающего с юга к четырем очагам, в которых был собран материал и изолированы штаммы «группы 886». Через 11 дней после укуса больной был госпитализирован с диагнозом «менингоэнцефалит» и скончался на 11-й день болезни [15]. Обнаружение РНК ВКЭ в образцах продолговатого мозга, коры головного мозга и мягкой мозговой оболочки указывает на многоуровневую локализацию поражения, которая присуща, по данным литературы, наиболее тяжелым формам острого КЭ, приводящим к летальному исходу и инвалидизации [13].

Учитывая уникальность генетических и антигенных свойств штамма 886-84, он сам и штаммы, входящие в данную группу, возможно, могут рассматриваться как кандидаты для создания универсальных, эффективных в отношении различных серотипов (субтипов) ВКЭ диагностикумов и вакцин, проблема создания которых до сих пор остается актуальной. Мы провели изучение штаммов ВКЭ «группы 886» по комплексу критериев, предложенных Л.С. Веретой и М.С. Воробьевой и предъявляемых к таким штаммам [3].

При исследовании штаммов в реакции гемагглютинации с гусиными эритроцитами все штаммы ВКЭ «группы 886» проявляли гемагглютинирующую активность (титр в РГА 1:1280-10240). В РДПА с перекрестно адсорбированными штаммоспецифическими сыворотками штамм 886-84 проявлял одинаковую степень родства со всеми подтипами ВКЭ. Высокая степень антигенного перекреста с восточносибирским и дальневосточным серотипами отмечена в РН у штаммов 886-84, 711-84 и 740-84. В РН штамм 886-84 проявлял антигенное родство со штаммом Лесопарк-11, штамм 740-84 – с дальневосточным штаммом Софьин и штаммом Лесопарк-11. Штамм 711-84 не удалось четко типировать в данной реакции.

Одним из важных генетических признаков, который учитывается при первоначальном отборе штаммов ВКЭ для производства инактивированных препаратов, является устойчивость вирусов к прогреванию. Показатель  $IgT_{50}$ /мл при 37°C варьировал от 3,5 до 8,26. По маркеру терморезистентности все изученные штаммы разделились на три группы: термостабильные ( $T^{50+}$ ) – девять штаммов, термолабильные ( $T^{50-}$ ) – один штамм и занимающие промежуточное положение ( $T^{50\pm}$ ) – три штамма. Все штаммы, изолированные от клещей *I. persulcatus*, собранных на территории Красночикокойского района Забайкальского края, оказались термостабильными.

При заражении культуры клеток СПЭВ все штаммы ВКЭ «группы 886» вызвали деструкцию клеточного моноста на 4-6-е сутки. Определение размера бляшек в культуре клеток под агаровым покрытием (S-признак)

показало гетерогенность изученных штаммов по данному маркеру. Так, штамм 740-84 формировал крупные бляшки диаметром 3,0 мм ( $S^+$ ), штамм 886-84 – средние  $d=2,0$  мм ( $S^+$ ), штамм 711-84 – мелкие бляшки  $d=1,-1,5$  мм ( $S^-$ ).

Изучение способности штаммов размножаться при 42°C показало гетерогенность штаммов ВКЭ «группы 886» по этому признаку. Пять изученных штаммов лучше размножались в культуре клеток СПЭВ при супраоптимальной температуре (42°). Причем из девяти «клещевых» штаммов – 8 имели  $rct_{42+}$ -признак. Среди штаммов «группы 886», изолированных от грызунов, наблюдалась большая гетерогенность. Штамм 740-84 обладал  $rct_{42+}$ -признаком, штамм 886-84 –  $rct_{42-}$ -признаком, штамм 711-84 –  $rct_{42+}$ -признаком. Все штаммы, изолированные от иксодовых клещей, отловленных на территории Красночикокойского района Забайкальского края, активно репродуцировались при температуре 42°C.

Таким образом, получены новые данные об оригинальном варианте ВКЭ, циркулирующем на территории Восточной Сибири. Показана уникальность генетической структуры штаммов ВКЭ «группы 886», которая представляет собой «переплетение» из аминокислотных последовательностей, характерных для генотипов 1, 2 и 3. Показано, что данный вариант ВКЭ может рассматриваться как самостоятельный генотип 5 ВКЭ (высокий уровень генетических отличий от других генотипов – более 12%, наличие собственного ареала, экологическая связь со всеми звеньями трансмиссивной цепи, участие в инфекционной патологии человека, стабильность и длительность циркуляции в природе). Выявленная способность развития очаговых форм КЭ с летальным исходом и результаты лабораторной оценки степени вирулентности свидетельствуют о высоком патогенном потенциале ВКЭ «группы 886». Изучение генетических маркеров, связанных с особенностями внутриклеточной репродукции, показало, что штаммы «группы 886» обладают хорошими адаптивными способностями и, следовательно, могут легко приспосабливаться к циркуляции в составе разнообразных биоценозов на территории различных ландшафтно-географических зон. Среди исследованной выборки имеются штаммы, обладающие широким спектром антигенных связей, хорошей гемагглютинирующей и нейтрализующей активностью, высокой степенью вирулентности, устойчивостью к воздействию высоких температур. Они соответствуют основным критериям, используемым при первоначальном отборе штаммов на роль кандидатов для приготовления диагностических и вакцинных препаратов.

Авторы выражают благодарность коллегам, принимавшим участие в сборе полевого материала, а именно, сотрудникам отдела природно-очаговых инфекций ИЭМ: Е.В. Арбатской, И.В. Воронко, О.З. Горину, Н.А. Гусаровой, Г.А. Данчиновой, В.М. Коган, С.И. Липину, О.В. Мельниковой, А.Г. Трухиной.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андаев Е.И., Сидорова Е.А., Борисова Т.И. и др. Клещевой энцефалит в Забайкальском крае и молекулярно-биологическая характеристика возбудителя // Национальные приоритеты России. – 2011. – Т. 5. №2. Спец. выпуск. – С.148-150.
2. Бочкова Н.Г., Жезмер В.Ю., Трухина А.Г. и др. Изучение серотипа Айна/1448 вируса клещевого энцефалита // Вопр. вирусол. – 1985. – №5. – С.572-575.
3. Верета Л.А., Воробьева М.С. Природная гетерогенность и целенаправленный отбор штаммов вируса клещевого энцефалита. – М.: Медицина, 1990. – 124 с.
4. Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Верхозина М.М. и др. Генетическая вариабельность и генотипирование вируса клещевого энцефалита с помощью дезоксирибонуклеотидных зондов // Вопр. вирусол. – 2009. – №3. – С.33-42.
5. Злобин В.И., Демина Т.В., Мамаев Л.В. и др. Анализ генетической вариабельности штаммов вируса клещевого энцефалита по первичной структуре фрагмента гена белка

оболочки Е // Вопр. вирусол. – 2001. – №1. С.2-16.

6. Злобин В.И., Демина Т.В., Беликов С.И. и др. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа гомологии фрагмента гена белка оболочки // Вопр. вирусол. – 2001. – №1. – С.16-21.

7. Злобин В.И., Беликов С.И., Джиоев Ю.П. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. – Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН, 2003. – 271 с.

8. Карань Л.С., Маленко Г.В., Бочкова Н.Г. и др. Применение молекулярно-генетических методов для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита // Бюллетень СО РАМН. – 2007. – №4. – С.34-40.

9. Кларк Д. Дальнейшие исследования антигенных связей между арбовирусами группы Б // Бюллетень ВОЗ. – 1964. – Т. 31. №1. – С.50-67.

10. Молекулярная клиническая диагностика: метод / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.

11. Овчинникова Э.А., Карпович Л.Г., Левкович Е.Н. Изучение терморезистентности штаммов вируса комплекса

клещевого энцефалита, обладающих различной нейровирусностью для лабораторных животных // Вопр. вирусол. – 1967. – №5. – С.607.

12. *Погодина В.В., Савинов А.П.* Variation in the pathogenicity of viruses of the tick-borne encephalitis complex for different animal species. I. Experimental infection of mice and hamsters // Acta virologica. – 1964. – №8. – С.424-434.

13. *Погодина В.В., Левина Л.С., Карань Л.С. и др.* Летальные исходы клещевого энцефалита, вызванного сибирским подтипом возбудителя в европейской части России и на Урале // Мед. вирусология. – 2009. – Т. XXVI. – С.121-122.

14. *Трухина А.Г.* Особенности циркуляции возбудителя КЭ в зоне распространения двух серотипов вируса на территории Прибайкалья: Дис. ... канд. мед. наук. – Иркутск, 1989. – 176 с.

15. *Khasnatinov M.A., Danchinova G.A., Unursaikhan U., et al.* Characterization of tick borne encephalitis virus that

caused the lethal meningoencephalitis human in Mongolia // Inter. Conference Zoonotic infections disease and tourism. – Ulaanbaatar, 2009. – P.88-93.

16. *Pletnev A.G., Yamshikov V.F., Blinov V.M.* Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polypeptide of tick-borne encephalitis virus // Virology. – 1990. – Vol. 174. – P.250-263.

17. *Reed L., Muench H.A.* A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints // Am. J. Hyg. – 1938. – №27. – P.493-497.

18. *Rubin S.G., Chumakov M.P.* New data on the antigenic types of tick-borne encephalitis (TBE) virus // Arboviruses in the Mediterranean Countries. – Stuttgart, New York, 1980. – P.231-236.

19. *Tamura K., Peterson D., Peterson N., et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – Vol. 28. №10. – P.2731-2739.

**Информация об авторах:** 664025, Иркутск, Карла Маркса, 3, ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, Институт эпидемиологии и микробиологии, лаборатория молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, тел. (3952) 333951, Козлова Ирина Валерьевна – д.м.н., руководитель лаборатории, e-mail: diwerhoz@rambler.ru; Верховина Марина Михайловна – к.б.н., биолог, тел. (3952) 234197, e-mail: diwerhoz@rambler.ru; Демина Татьяна Васильевна – к.б.н., с.н.с., e-mail: demina2006@mail.ru; Джигоев Юрий Павлович – к.б.н., с.н.с., e-mail: alanir07@mail.ru; Ткачев Сергей Евгеньевич – н.с., 630090, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева, д. 8, тел. (383) 333677, e-mail: sergey.e.tkachev@mail.ru; Карань Людмила Станиславовна – с.н.с., тел. (495) 305-5424, e-mail: karan@prc.ru; Дорошенко Елена Константиновна – м.н.с., e-mail: doroshchenko-virus@mail.ru; Лисак Оксана Васильевна – м.н.с., e-mail: lisak.lisa@rambler.ru; Сунцова Ольга Владимировна – н.с., e-mail: Olga\_syntsova@list.ru; Парамонов Алексей Игоревич – м.н.с., e-mail: paramonov\_a.i@mail.ru; Черноиванова Ольга Олеговна – м.н.с., e-mail: na\_sviazi@mail.ru; Ревизор Александр Олегович – аспирант, e-mail: alexandrrev@rambler.ru; Злобин Владимир Игоревич – академик РАМН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой, e-mail: vizlobin@mail.ru.

© ДРУЖИНИНА Т.А., БАРАНОВА Н.С. – 2012

УДК: 616-036.22

## КЛЕЩЕВОЙ ВИРУСНЫЙ ЭНЦЕФАЛИТ В ЯРОСЛАВСКОЙ ОБЛАСТИ: ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ, КЛИНИКИ, ПРОФИЛАКТИКИ

*Татьяна Александровна Дружинина<sup>1</sup>, Наталия Сергеевна Баранова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Управление Роспотребнадзора по Ярославской области, руководитель – С.А. Мелюк,

<sup>2</sup>Ярославская государственная медицинская академия, ректор – д.м.н., проф. А.В. Павлов

**Резюме.** В статье представлены данные многолетнего эпидемиологического мониторинга клещевого вирусного энцефалита (КВЭ) в Ярославской области, расположенной на территории Центрального Федерального округа. Проведен ретроспективный анализ динамики заболеваемости КВЭ, особенностей клиники заболеваний, антропогенных очагов. Представлены данные энтомологических и лабораторных исследований иксодовых клещей, свидетельствующие о потенциальной возможности заражения людей КВЭ через укусы клещей рода *Dermacentor*. Дана оценка результатов профилактики КВЭ в Ярославской области, позволяющей удерживать заболеваемость на низком уровне – иммунизации населения области, acaricidным обработкам мест массового пребывания, постоянного и временного проживания людей, в первую очередь, в активных очагах КВЭ.

**Ключевые слова:** клещевой вирусный энцефалит, эпидемиологический мониторинг, природные и антропогенные очаги, иксодовые клещи, вакцинопрофилактика, acaricidные обработки.

## TICK-BORNE VIRAL ENCEPHALITIS IN THE YAROSLAVL REGION: EPIDEMIOLOGY, CLINICAL AND PROPHYLAXIS DATA

*T.A. Druzhinina<sup>1</sup>, N.S. Baranova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Department of Rospotrebnadzor of Yaroslavl region; <sup>2</sup>Yaroslavl State Medical Academy

**Summary.** In the article the facts of many years epidemiological monitoring of tick-borne viral encephalitis in the Yaroslavl region (the Central federal district) are presented. The retrospective analysis of dynamics of TVE sickness rate, the features of clinical picture of the disease and anthropological hotbeds of the infection was carried out. The facts about entomological and laboratory investigations of ticks (*Ixodidae*) were presented. They indicate the potential possibility of contamination with TVE by means of ticks genus *Dermacentor*. The estimate of the results of TVE prophylaxis in Yaroslavl region was given. The prophylaxis allows to hold the illness rate on the low level and includes: immunization of the population of the region, acaricid treatment of mass people places of constant and temporary residence, in the first place in the active hotbeds of TVE.

**Key words:** the tick-borne viral encephalitis, epidemiological monitoring, natural and anthropogenic hotbeds, ixodic ticks, vaccine prophylaxis, acaricid treatment.

Ярославская область является одной из эндемичных по вирусному клещевому энцефалиту (КВЭ) территорий в Центральном федеральном округе, где ежегодно регистрируются случаи этой тяжелой нейроинфекции.

По уровню заболеваемости регион находится на втором месте после Костромской области, граничащей с Ярославской областью. Интенсивность эпидемического процесса КВЭ на территории области на протяжении