

ТАБЛИЦА 1.

Динамика заболеваемости и летальности при клещевом энцефалите по десятилетиям (1980–2015 гг.)

Годы	Число пациентов КЭ	Колебания показателей заболеваемости на 100 тыс. населения	Число летальных случаев	Средний показатель летальности (%)
1980-1989	303	1,0 – 2,1	85	28±2,5
1990-1999	1386	3,8 – 9,88	212	15,3±0,9
2000-2009	751	1,25 – 7,9	79	10,5±1,1
2010-2015	181	0,85 – 2,88	10	5,2±1,9
Всего	2621	0,85 – 9,88	386	14,7±0,7

Анализируя особенности КЭ в Приморском крае можно сказать о том, что здесь наряду с крайне тяжелыми формами заболевания, неизбежно ведущими к летальному исходу, все же большая часть случаев КЭ представляет бессимптомную инфекцию. Положительные результаты проб присосавшихся клещей или крови пациентов чаще всего выявляют лишь генетический маркер РНК в ПЦР или антиген вируса в ИФА. Возможно, это свидетельствует о получении реципиентом субпороговой дозы возбудителя, недостаточной для развития инфекционного процесса [Коренберг Э.И., 2012]. Зараженность биопроб полноценным вирусом КЭ, способным к репликации, можно выявить только с помощью классических вирусологических способов изоляции возбудителя. Такой полноценный вирус способен вызывать многообразие клинических форм инфекции от легких лихорадочных до очаговых с летальным исходом.

DOI: 10.26100/34MW-6E44

1.2. Биологическая и молекулярно-генетическая характеристика штаммов вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа

(Г.Н. Леонова, С.И. Беликов)

Нами было показано, что комплексные исследования по изучению биологической характеристики с расшифровкой полногеномной нуклеотидной последовательности штаммов вируса КЭ, вызвавших инаппарантную, лихорадочную и очаговые формы инфекции у людей в дальневосточном регионе, способны выявить особенности проявления вирулентных свойств этого возбудителя [Leonova G.N. et al., 2013]. Определены нуклеотидные последовательности полных геномов 35 штаммов вируса КЭ, которые были депонированы в международной базе GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) под номерами:

FJ402886 – Dalnegorsk, FJ402885 – Kavaleroovo, JQ825146 – Kiparis-94, GQ228395 – Primorye-18, JQ825154 – Primorye-52, EU816453 – Primorye-69, JQ825152 – Primorye-75, JQ825148 – Primorye-82, EU816455 – Primorye-86,

JQ825149 – Primorye-87, FJ906622 – Primorye-89, FJ997899 – Primorye-90, JQ825150 – Primorye-91, HQ201303 – Primorye-92, EU816454 – Primorye-94, JQ825153 – Primorye-183, JQ825155 – Primorye-196, JQ825157 – Primorye-202, JQ825158 – Primorye-208, EU816450 – Primorye-212, EU816451 – Primorye-253, EU816452 – Primorye-270, JQ825159 – Primorye-274, JQ825160 – Primorye-320, AY169390 – Primorye-332, JQ825161 – Primorye-345, JQ825162 – Primorye-437, JQ825156 – Primorye-739, JQ825163 – Primorye-750, JQ825164 – Primorye-823, JQ825144 – Primorye-828, JQ825145 – Primorye-895, JQ825147 – Shkotovo-94, JQ825151 – Spassk-72, GU121642 – Svetlogorie [Belikov S.I. et al., 2014].

Построено филогенетическое дерево, на котором видно, что все штаммы, независимо от тяжести заболевания, принадлежат к вирусу клещевого энцефалита I субтипа (рис. 2). Большая часть штаммов, вызвавших инаппарантное течение инфекции, формирует отдельный кластер (I) вместе с опубликованным ранее штаммом Oshima 5-10 (Япония). Два других кластера с прототипными штаммами дальневосточным – Sofjin (кластер II) и северокитайским – Senzhang (кластер III) формируют в основном патогенные штаммы, вызвавшие манифестные формы клещевого энцефалита. Штамм Shkotovo-94, вызвавший лихорадочную форму, следует рассматривать как промежуточный вариант между кластерами I и II. Другие штаммы, вызвавшие лихорадочную форму заболевания, располагаются в кластере I (Kiparis-94, Primorye-82) и в кластере II (Primorye-94).

Из анализа аминокислотных последовательностей полипротеина следует, что расположение замен аминокислотных остатков в основном случайно, за исключением 18 позиций в полипротеине, которые однозначно различаются у групп инаппарантных и патогенных для человека штаммов вируса КЭ и являются консервативными в каждой группе. Из 18 позиций только 4 замены приводят к изменению гидрофобности аминокислот, и именно они оказывают решающее влияние на патогенность штаммов. Исходя из механизма проникновения в клетку и размножения вируса клещевого энцефалита, наиболее важными заменами может быть сочетание делеции 111 аминокислоты в капсидном белке и замена гидрофильной аминокислоты на гидрофобную (45Ser→Phe) в вирусной протеазе NS3. В капсидном белке 111 аминокислота, расположенная в сигнальной последовательности, является вырожденной у патогенных штаммов и представлена Leu, Met или Val, у штаммов, вызвавших инаппарантную инфекцию, этот аминокислотный остаток отсутствует. Он расположен на С-конце белка в сигнальной последовательности, которая обеспечивает узнавание белка сигназой клетки-хозяина, отщепляя N-конец белка ргМ от полипротеина. Кроме того, выявлена замена 141Ser→Gly в белке NS1, однако пока не ясно, влияет ли эта замена на патогенность штаммов. В белке NS5 в домене РНК-полимеразы у инаппарантных штаммов найдено 4 замены, три из которых консервативные (634Ser→Thr, 677Arg→Lys, 693Ile→Val) и одна замена 724Ala→Ser изменяет гидрофильность аминокислотного остатка и может влиять на патогенность штаммов.

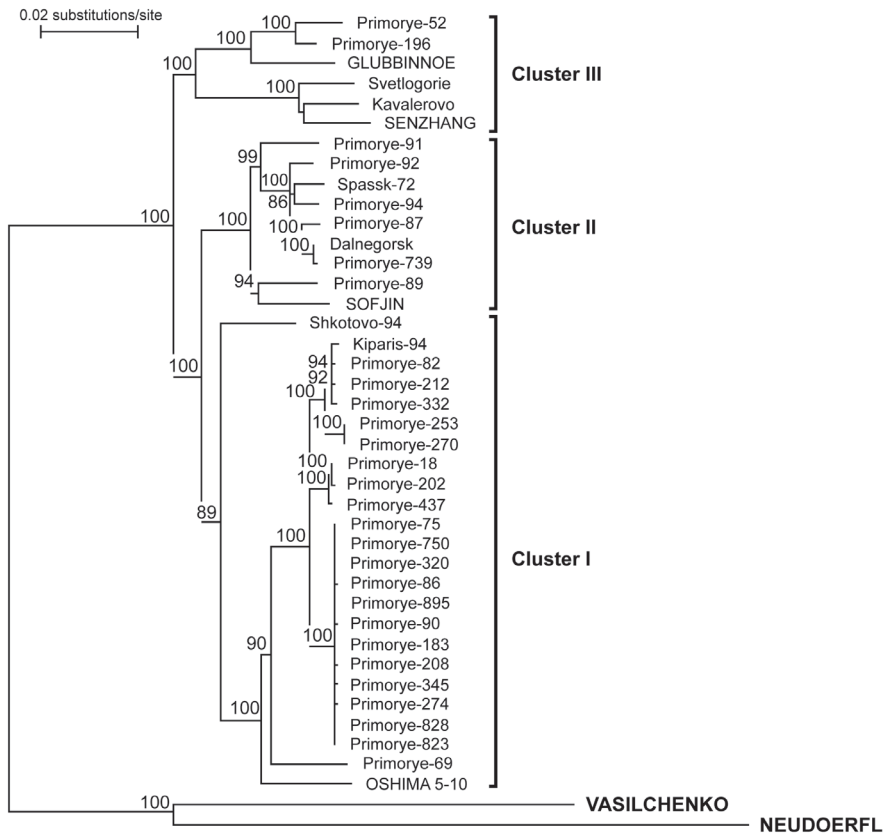


Рис. 2. Филогенетическое дерево на основе полногеномного секвенирования дальневосточных штаммов вируса КЭ, вызвавших интранаттную, лихорадочную и очаговые формы КЭ. Кластер I – Oshima-подобные штаммы, кластер II – Sofjin-подобные и кластер III – Senzhang-подобные штаммы вируса КЭ.

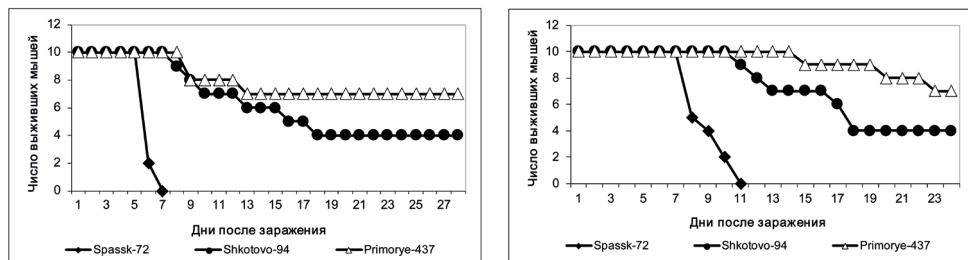
Определена важная биологическая характеристика вируса – вирулентность для неинбредных мышей (табл. 2). На рис. 3 показано проявление вирулентности трех штаммов – представителей разных групп (Spassk-72, Shkotovo-94, Primorye-437), свидетельствующее о том, что степень нейроинвазивности штаммов лучше всего выявляется на взрослых мышах при подкожном введении инфекционного инокулята.

Механизм развития инфекционного процесса в организме белых мышей при заражении их разными штаммами вируса КЭ различается (рис. 3). Эти штаммы при в/м ($10 LD_{50}$) и при п/к ($1000 LD_{50}$) введении животным проявили разную степень вирулентности (нейроинвазивности). Дополнительная информация по вирулентности изучаемых штаммов получена при наблюдении за динамикой накопления вируса в органах белых мышей (рис. 4).

ТАБЛИЦА 2.

Характеристика штаммов вируса клещевого энцефалита I субтипа
(в/м – внутримозговое, п/к – подкожное заражение)

№ п/п	Штамм	Пассаж	Район изоляции	Год изоляции	Титр вируса на белых мышцах (lg LD ₅₀ в 1 мл)		Индекс инвазивности (И.И.)
					в/м	п/к	
Штаммы, вызвавшие очаговые формы КЭ							
1	Spassk-72	VI	Спасский	1972	8,0	6,3	1,7
2	Dal'negorsk	VIII	Дальнегорский	1973	9,8	9,5	0,3
3	Kavalerovo	V	Кавалеровский	1985	9,1	8,2	0,9
4	Primorye-86	IX	Кировский	1986	10,0	9,5	0,5
5	Primorye-87	V	Кавалеровский	1987	8,0	6,7	1,3
6	Primorye-89	VII	Арсеньев	1987	9,8	7,9	1,9
7	Primorye-90	VII	Арсеньев	1990	10,0	9,7	0,3
8	Primorye-92	IV	Владивосток	1992	10,5	8,1	2,4
	M±m				9,4±0,33	8,2±0,45	1,16±0,28
Штаммы, вызвавшие лихорадочную форму КЭ							
1	Primorye-82	IX	Пригород Владивостока	1982	10,1	8,7	1,4
2	Shkotovo-94	V	Шкотовский,	1994	9,1	7,5	1,6
3	Primorye-94	VI	Надеждинский	1994	9,5	7,4	2,1
4	Kiparis-94	III	Надеждинский,	1994	10,7	8,7	2,0
	M±m				9,8±0,35	8,1±0,36	1,8±0,16
Штаммы, вызвавшие инаппарантную форму КЭ							
1	Primorye-183	IV	Надеждинский	1991	9,3	7,5	1,8
2	Primorye-212	II	Пригород Владивостока	1991	10,5	6,9	3,6
3	Primorye-253	II	Надеждинский,	1991	8,3	6,7	1,6
4	Primorye-270	III	Надеждинский,	1991	8,3	6,9	1,4
5	Primorye-332	V	Надеждинский	1991	8,5	6,7	1,8
6	Primorye-739	IV	в черте Владивостока	1992	8,8	6,2	2,6
7	Primorye-18	V	Владивосток	1997	11,0	7,7	3,3
8	Primorye-202	VI	Надеждинский,	1997	11,0	7,3	3,7
9	Primorye-750	III	Надеждинский, Кипарисово	1998	9,0	6,4	2,6
10	Primorye-828	IV	Черниговка	1998	9,3	7,3	2,0
11	Primorye-52	V	Шкотовский, Анисимовка	1999	9,1	7,9	1,2
12	Primorye-75	II	Надеждинский	1999	10,5	7,7	2,8
13	Primorye-274	III	Надеждинский	1999	9,2	8,0	1,2
14	Primorye-345	V	Пригород Владивостока	1999	9,0	6,7	2,3
15	Primorye-320	II	Шкотовский	1999	10,3	8,9	1,4
16	Primorye-437	VIII	р-н б.Лазурная	1999	7,7	5,5	2,0
17	Primorye-69	VI	Уссурийский	2000	7,7	7,0	0,7
18	Primorye-196	VII	р-н б.Лазурная	2000	8,2	3,7	4,5
19	Primorye-823	II	Красноармейский	2000	9,5	7,7	1,8
	M±m				9,2±0,23	7,0±0,25	2,2±0,22



A

B

Рис. 3. Выживаемость мышей, инфицированных штаммом Spassk-72 (вызвал очаговую форму клещевого энцефалита, принадлежит к кластеру II), штаммом Shkotovo-94 (вызвал лихорадочную форму, промежуточный между кластерами I и II), штаммом Primorye-437 (вызвал инаппарантную форму, принадлежит к кластеру I)

A – внутримозговое заражение ($10 LD_{50}$);

B – подкожное заражение ($1000 LD_{50}$).

Как видно на этом рисунке, одинаковая заражающая доза ($3 \lg TЦД_{50}$) для трех штаммов показала различия в ходе развития инфекционного процесса. Штаммы вируса КЭ, вызвавшие манифестные формы у людей, в крови белых мышей появились на 3 сутки, самый высокий показатель зарегистрирован для штамма Spassk-72 ($4 \lg TЦД_{50}$). Штамм P-437 в крови экспериментальных животных появился на 5 сутки в низком титре ($1 \lg TЦД_{50}$). Пик вирусемии для штаммов II-го кластера (Spassk-72, Shkotovo-94) пришелся на 5 сутки, для штамма I-го кластера (P-437) – только на 11 сутки. В селезенке пик накопления штаммов Spassk-72 и Shkotovo-94 пришелся также на 5 сутки, превышая показатели титра этих штаммов в крови, а для штамма P-437 – на 11 сутки. В мозге зараженных животных штаммы Spassk-72 и Shkotovo-94 стали выявляться на 5 сутки, т.е. на пике вирусемии. Пик накопления вируса в мозге ($6 \lg TЦД_{50}$) для штамма Spassk-72 наблюдали на 9-11 сутки (срок гибели животных). Для Shkotovo-94 максимальный показатель ($4 \lg TЦД_{50}$) был отмечен на 7 сутки. Штамм P-437 показал свою особенность: в мозге зараженных белых мышей, как и в крови, он появился только на 7-е сутки ($1 \lg TЦД_{50}$), затем титр вируса стал постепенно повышаться, достигая максимума ($4 \lg TЦД_{50}$) на 11 сутки и ($6 \lg TЦД_{50}$) – на 14 сутки соответственно.

Изменения показателей веса и температуры тела белых мышей, зараженных этими штаммами вируса клещевого энцефалита, указывали на степень тяжести инфекционного процесса. Штамм Spassk-72 вызвал у мышей быстрое падение веса с последующей их гибелью. У животные, зараженных штаммом Shkotovo-94, начиная с 9 суток, резко снижались вес и температура тела. Животные, зараженные инаппарантным штаммом P-437, до 8-х суток набирали массу тела, как и животные в контрольной группе, а затем постепенно стали ее терять.

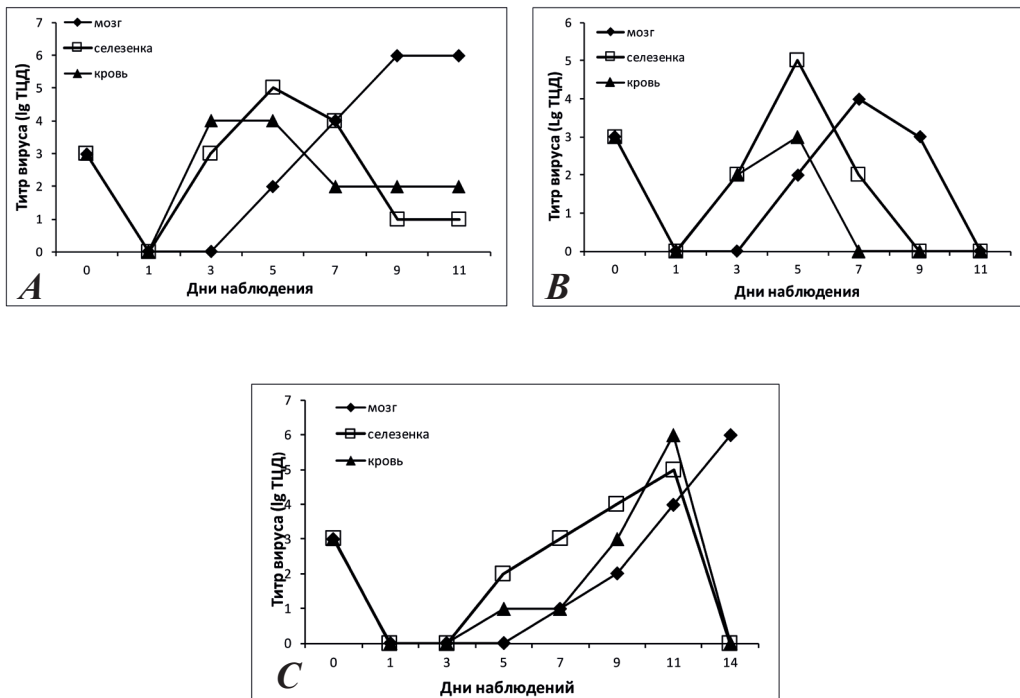


Рис. 4. Динамика накопления вируса в органах (мозг, селезенка, кровь) белых мышей, зараженных разными штаммами вируса КЭ: А – штамм Spassk-72, вызвавший очаговую форму, В – Shkotovo-94 – лихорадочную форму, С – Primorye-437 – инapparантную форму КЭ. По оси абсцисс – титр вируса в lg ТЦД₅₀ по оси ординат – дни наблюдения после инфицирования.

Современный уровень исследования биологии вирусов рассматривает вирулентность как фенотипическое проявление полигенного наследственного признака патогенности [Heinz F., 2003]. И если патогенность это постоянный видовой признак, то вирулентность – его варьирующий индивидуальный признак [McMinn P., 1997]. Важно понять, как главные свойства (полногеномная характеристика и степень вирулентности) гетерогенной вирусной популяции взаимосвязаны и как они могут отразиться на течении инфекционного процесса у больных клещевым энцефалитом. Научный интерес последних лет направлен на выявление молекулярных механизмов нейровирулентности и нейроинвазивности вирусов [Hayasaka D. et al., 1999; 2001; Goto A. et al., 2003; Карганова Г.Г., 2009].

В настоящее время обсуждаются три возможных механизма разрушения вирусами ткани мозга. Во-первых, сам вирус вызывает прямое повреждение нейронов. Во-вторых, гибель нейронов вызывается вирус-индуцированной воспалительной реакцией. И, наконец, сочетание обоих механизмов служит

причиной тяжелого течения инфекционного процесса [King A. et al., 2007]. Интересные данные продемонстрированы в последних работах D. Ruzek с соавт. (2009; 2011), посвященных иммунопатологии клещевого энцефалита и нарушениям гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) у экспериментально зараженных неинбредных мышей с различными иммунодефицитами. В итоге авторы пришли к выводу о том, что у нормальных мышей с полноценно развитой иммунной системой наблюдаются два повреждающих фактора: прямое разрушающее действие вируса на клетки ЦНС и иммунопатологическая реакция. Эти факторы влияют на клинический исход заболевания у людей и животных [Ruzek D. et al., 2009a]. Изменение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) является отличительной особенностью многих инфекций ЦНС и, вероятно, имеет существенное влияние на прогрессирование заболевания [Olsen A. et al., 2007]. Рассматривая результаты по изучению накопления вируса клещевого энцефалита на лабораторной модели белых мышей (рис. 4), зараженных высоковирулентным штаммом Spassk-72, уже через 1 сутки после заражения в мозге определялись начальные реактивные изменения в структурах ГЭБ (мозговых оболочках, сосудистых сплетениях), а на 5-7 сутки отмечены деструктивные изменения в «индикаторных зонах» мозга (подкорковые и стволовые структуры, мозжечок) [Somova et al., 2013]. Основываясь на литературных данных [Tigabu B. et al., 2009; Ruzek D. et al., 2011], можно предположить, что уже на раннем этапе инфекционного процесса наблюдалось повреждение гематоэнцефалического барьера у мышей, зараженных штаммом Spassk-72. Затем у животных последовало резкое снижение массы тела, а также повышение титра вируса в мозге, сопровождавшееся деструктивными изменениями клеток. Несмотря на низкую заражающую дозу вируса ($3 \lg \text{ТЦД}_{50}$) развилась острая клиника и летальный исход у всех животных, что указывало, скорее всего, на сочетанный механизм тяжелого течения инфекционного процесса, связанный с прямым повреждением нейронов и вирус-индуцированной воспалительной реакцией.

В противоположность этому штамм Р-437, вызвавший инаппарантную форму инфекции у человека, имел длительный период накопления вируса в мозге экспериментально зараженных белых мышей (7-14 суток), у которых была отмечена лишь незначительная реакция сосудов мягкой мозговой оболочки. Выявленные нами точечные мутации в активном центре вирусной сериновой протеазы (в комплексе NS2B/NS3), вероятно, способствовали задержке накопления вируса в месте инокуляции, ограничивая распространение его в ЦНС. Такой характер повреждения обсуждался в работах других авторов [Ruzek D. et al., 2009a, 2011]. В поздние сроки у мышей, зараженных штаммом Р-437, были обнаружены распространенные тяжелые поражения нейронов по типу лизиса [Somova L. et al., 2013].

Кроме того, спустя 8 дней после заражения наметилось падение веса животных, и только после 14 дня наблюдали стойкое снижение его. Температура тела животных снижалась постепенно, литически. Видимо, для штамма Р-437 характерно прямое проникновение вируса в мозг без нарушения ГЭБ. Такой путь, при котором низковирулентный штамм вируса клещевого энцефалита проходил длительный путь репликации в организме, доказан экспериментально [Ruzek D. et al., 2011]. Итак, характерной особенностью штаммов, вызвавших инаппарантную форму клещевого энцефалита, является длитель-

ный период накопления вируса в организме зараженных белых мышей, слабая реакция клеток ГЭБ, деструкция нейронов в отдаленные сроки наблюдения.

Штамм Shkotovo-94, занимающий на филогенетическом дереве промежуточное положение между кластерами I и II, имеет совпадающие изменения 15-ти аминокислотных остатков из 18-ти, характерные для штаммов вируса, вызвавших очаговую форму заболевания. И только 3 замены аминокислотных остатков (108Val в NS2B, 16 Lys и 45Phe в NS3) были характерны для штаммов, вызвавших инаппарантные формы клещевого энцефалита. Эти три последние замены находятся в вирусной протеазе, являющейся комплексом белков NS2B/NS3. Вероятно, такое нарушение приводит к снижению патогенного потенциала этих штаммов.

Таким образом, комплексные экспериментальные исследования, направленные на изучение молекулярной характеристики и вирулентности популяции вируса клещевого энцефалита, показали, что все штаммы вируса, выделенные от людей, независимо от зарегистрированной формы инфекционного процесса, проявляют патогенные свойства для человека. Однако патогенный потенциал (степень вирулентности) штаммов, изолированных от лиц с инаппарантной и с манифестными формами заболевания, имеет значительные различия. Каждый штамм вируса клещевого энцефалита при попадании в кровь несет свою генетическую информацию, в зависимости от которой могут происходить относительно благоприятные или драматические события в макроорганизме. Следует также отметить, что после укуса клеща при попадании в кровь «инаппарантных» штаммов вируса клещевого энцефалита, которые, как было показано нами [Леонова и др., 2007], составляют значительную часть вирусной популяции, вероятность выжить в макроорганизме невысокая. Уже в начальном периоде инфекционного процесса, как правило, происходит элиминация таких штаммов из организма. Штаммы, вызвавшие манифестные формы инфекции, могут по-разному проявить себя в макроорганизме. Это зависит не только от молекулярной характеристики возбудителя, но и от исходного состояния иммунной системы, которая, как известно, может также предопределить разное течение инфекционного процесса, способствуя либо элиминации вируса с последующим выздоровлением пациента, либо неблагоприятному исходу [Leonova G. et al., 2014; Krylova N. et al., 2015].

DOI: 10.26100/5DQY-TN22

1.3. Патология центральной нервной системы при дальневосточном клещевом энцефалите (Л.М. Сомова, Г.Н. Леонова)

В 1990-х годах как в дальневосточном, так и в других регионах России, активизировалась заболеваемость клещевым энцефалитом, которая достигла уровня 1940–1950-х годов, с повсеместным утяжелением клинических проявлений инфекции [Мамунц А.З., 1993; Злобин В.И., Горин О.З., 1996; Леонова Г.Н., 1997; Ерман Б.А. и др., 1999]. Дальневосточный вариант клещевого энцефалита издавна известен как тяжелая нейроинфекция, клинически протекающая преимущественно в виде очаговых паралитических форм с остаточными явлениями, иногда с переходом в хронически прогрессирующую форму, и высокой летальностью, достигающей 30-35% [Леонова Г.Н., 2007].