

ГЛАВА 4 ХРОНИЧЕСКИЙ КЛЕЩЕВОЙ ЭНЦЕФАЛИТ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПЕРСИСТЕНТНАЯ ИНФЕКЦИЯ

DOI: 10.26100/HFH7-J993

4.1. Молекулярно-генетическая характеристика и патогенность штаммов, изолированных при хроническом клещевом энцефалите человека *(В.В. Погодина, Е.Г. Демьяновская, Н.М. Колясникова)*

Переход клещевого энцефалита в хроническую форму был выявлен практически сразу после открытия этого заболевания. Хронический клещевой энцефалит (ХКЭ) является одним из неблагоприятных исходов инфицирования человеческого организма вирусом КЭ. У 15-20% переболевших острыми формами наблюдаются остаточные явления поражения центральной нервной системы, и в 3-11% случаев прогрессивное течение инфекции проявляется хроническим КЭ [Шаповал А.Н., 1976]. В 4% случаев наблюдается первично-прогрессивная форма КЭ [Жукова Н.Г. и др., 2002]

Место хронического клещевого энцефалита в структуре клинических форм КЭ обсуждается до сих пор. Существует ряд классификаций ХКЭ, учитывающих синдромальную характеристику заболевания [Глинских Н.П. и др., 2006], характер течения хронического процесса по отношению к острому периоду [Иерусалимский А.П., 2001], особенности клинических форм с учетом данных лабораторных исследований и исхода болезни [Жукова Н.Г. и др., 2002]. Унифицированная клиническая классификация на сегодняшний день не разработана.

Вирус КЭ проявляет пантропные свойства и персистирует в тех же отделах ЦНС и в лимфатических узлах, где размножается на начальном этапе развития заболевания в период висцеральной и невральской фаз инфекции. Чаще всего в ЦНС персистирует более активный и более вирулентный вирус. Характерна персистенция вируса КЭ на фоне выраженного гуморального иммунитета. Это связано с механизмами персистенции вируса: нарушением финальных этапов сборки вирионов, с одной стороны, и расстройством естественного механизма сероконверсии – с другой. Возможны различные исходы персистенции: прекращение, бессимптомное установление симбиотических отношений с организмом хозяина на фоне напряженного иммунитета, либо развитие хронического КЭ. Наиболее часто встречающаяся клиническая форма ХКЭ – гиперкинетическая, одной из её клинических синдромов является эпилепсия Кожевникова – одно из наиболее распространенных и по сути патогномоничных проявлений хронического течения КЭ [Волкова Л.И., 2009].

Высокой частотой хронических форм характеризовалась вспышка КЭ на Волховском фронте (Ленинградская область, 1942–1943 гг.) – до 8,2% переболевших острой формой КЭ [Труды врачей Волховского фронта, 1945].

Анализ клинико-эпидемиологических особенностей ХКЭ на Среднем Урале показал, что формирование хронических форм отмечалось преимущественно (65%) в возрасте до 39 лет. У 71,6% больных ХКЭ отсутствовали меры специфической профилактики КЭ. Риск хронизации процесса связан с перенесенными очаговыми формами КЭ: у детей – энцефалитической, у взрослых – полиомиелитической. Однако даже после лихорадочных и менингеальных форм прогрессирование болезни отмечалось у каждого пятого пациента (18,7%). ХКЭ в зоне доминирования сибирского подтипа, на Среднем Урале, характеризовался у детей поражением церебральных структур с развитием эпилептических форм заболевания и преобладанием синдрома кожевниковской эпилепсии, у взрослых – полиморфизмом клиники с преобладанием амиотрофических форм, полиомиелитического и энцефаломиелитического синдромов, а также синдрома бокового амиотрофического склероза (БАС) [Волкова Л.И., 2009].

Роль вируса клещевого энцефалита в этиологии хронических форм заболевания была впервые установлена М.П. Чумаковым при обследовании больных на Урале в 1940 г. и в Ленинградской области (Волховский фронт, 1942–1943 гг.). Наибольшее число штаммов, вызвавших хронизацию процесса, было выделено в 1960-е годы Н.Н. Краминской в сотрудничестве с Р.А. Мейеровой благодаря целенаправленному обследованию данной категории больных [Краминская Н.Н. и др., 1972; Мейерова Р.А., 1992]. В последующие годы в единичных случаях выделяли штаммы вируса КЭ от больных ХКЭ, в том числе штамм Заусаев от больного, умершего в 1986 г. в Томской области [Фролова Т.В. и др., 2008а]. В конце XX века роль вируса КЭ в этиологии хронических форм заболевания устанавливалась в основном молекулярно-генетическими методами без изоляции штаммов возбудителя. Кроме того, при хроническом прогрессирующем течении КЭ был установлен факт интеграции вирусного генома с геномом клеток ЦНС [Zhdanov V.M. et al., 1977].

Изолированные штаммы изучались в основном в отношении их патогенности и связи с различными серотипами и генотипами вируса КЭ [Gritsun T.S. et al., 2003]. Достоверно установлена связь 20-ти штаммов с различными субтипами вируса КЭ при использовании иммунологических методов (РДПА) и молекулярно-генетических методов (real-time PCR, секвенирование фрагментов и полноразмерного генома). Основное число штаммов (14) отнесены к сибирскому субтипу, 5 штаммов – к дальневосточному субтипу, один штамм являлся микст-штаммом сибирского и европейского субтипов (табл. 19).

Изучение и генотипирование штамма Айна/1448. Больная Айна М., 11 лет, имя которой присвоено серотипу вируса КЭ, открытому в Восточной Сибири. Начало острого периода – 06.06.1963 г., после купирования наблюдался остаточный парез и постоянные тонико-клонические судороги в правой руке. На пятый месяц болезни присоединились нарушения речи, а на седьмой месяц болезни усилились гиперкинезы, появились эпилептиформные приступы. Через 2 года к гиперкинезам присоединились атрофии, ригидность мышц и нистагм. На пятом году от начала заболевания усилился тремор правой ноги, гиперкинезы в мышцах плечевого пояса и статодинамический тремор головы по типу «нет-нет». Больную наблюдали в течение 21 года, все это время тремор сохранялся, эпилептиформные приступы на-

ТАБЛИЦА 19.

Генетическая характеристика штаммов, выделенных от больных ХКЭ

№ п/п	Наименование штамма	Форма ХКЭ	Субтип вируса КЭ
1	Айна/1448	ХКЭ, кожевниковская эпилепсия	Сибирский
2	41/65 (Irkutsk – 41, GenBank)	Полиоэнцефаломиелит, кожевниковская эпилепсия, летальный исход	Сибирский
3	592	Полиоэнцефаломиелит, кожевниковская эпилепсия	Сибирский
4	3/65	ХКЭ, менингоэнцефалит	Сибирский
5	305	ХКЭ	Сибирский
6	508	ХКЭ	Сибирский
7	515	ХКЭ	Сибирский
8	518	ХКЭ	Сибирский
9	106/67	ХКЭ	Сибирский
10	806/62	ХКЭ	Сибирский
11	763/62	ХКЭ	Сибирский
12	437	ХКЭ	Сибирский
13	Заусаев (Za, GenBank)	ХКЭ	Сибирский
14	560	ХКЭ	Сибирский
15	45/69	Сирингомиелия	Сибирский+европейский
16	Тройник (Т-к)	Кожевниковская эпилепсия	Дальневосточный
17	Хромов	Рецидивирующая форма, летальный исход	Дальневосточный
18	1024	ХКЭ	Дальневосточный
19	Гурбов	ХКЭ	Дальневосточный
20	Прищепа	ХКЭ	Дальневосточный

блюдались раз в 2 – 3 года, однако изменений личности и снижения интеллекта не отмечалось. Диагноз: хронический КЭ, кожевниковская эпилепсия (наблюдение Р.А. Мейеровой, штамм выделен Н.Н. Краминской).

В реакции бляшкообразования штамм Айна проявил высокую активность, титр вируса 7×10^{10} БОЕ/мл. При интрацеребральном введении вируса в мозг обезьян макак – резус и яванских макак заболевание в 100% случаев протекало по типу острого энцефалита с инкубационным периодом 4-6 дней; у 33,3% обезьян болезнь закончилась летально до 11-го дня. Наибольшее содержание вируса отмечалось в ткани головного и спинного мозга. У 66,7% обезьян была установлена персистенция вируса КЭ, в мозге выявлены морфологические признаки хронически текущего процесса. Изоляты персистирующего штамма Айна/1448 обладали патогенностью для мышей, вызывали цитопатогенное действие (ЦПД) в культуре СПЭВ и образовывали бляшки диаметром 1,2-2,5 мм. Гибель сирийских хомяков наступала в 12,6% при средней продолжительности жизни (СПЖ), равной 437 дням.

Впервые антигенное своеобразие штамма Айна было установлено в 1980 году в РДПА [Rubin S.G., Chumakov M.P., 1980]. В Иркутской области в период 1978–1980 были изолированы многочисленные штаммы ВКЭ, в том числе штаммы, антигенно сходные в РДПА со штаммом АЙНА/1448. Проведенные исследования показали широкое распространение таких штаммов и их роль в этиологии острого и хронического КЭ, а также в формировании популяционного иммунитета у населения Иркутской, Читинской, Курганской областей и Красноярского края. Полученные результаты свидетельствовали о существовании ранее неизвестного серотипа, который первоначально был обозначен по наименованию штамма АЙНА/1448, а затем как сибирский [Погодина В.В. и др., 1981, 1986]. Генотипирование штамма Айна по Е-гену показало принадлежность его к сибирскому субтипу (GenBank AF091006) [Ecker et al., 1999]. При изучении клонов штамма Айна А-54 и А-64 установлена их принадлежность к сибирскому субтипу [Безрукова Е.Г., 2009]. Один из клонов А-67 генотипирован как микст-клон сибирского и европейского субтипов.

Штамм 41/65 изолирован от больной З. в 1965 г. на 237-й день заболевания. Заболела остро 15.06.1964 г., была потеря сознания, неоднократная рвота, судороги, развился правосторонний гемипарез, афазия, парез взора вправо, двусторонний птоз. Через 5 недель состояние улучшилось, но при ходьбе отмечались клонические судороги. Появились признаки кожевниковской эпилепсии. На 3-й месяц от начала заболевания усилился гиперкинез правых конечностей, наблюдался эпилептиформный приступ, выявилась атрофия шейных мышц, в силу чего появился симптом «свислой головы». Парез правой руки перешел в паралич, тремор сохранялся, повисла правая стопа, появился симптом «когтистой лапы», тонус всех мышц был повышен по пирамидному типу. 16.02.1965 г. пациентка заболела ангиной, затем присоединился плеврит, появились птоз и феномен «головы куклы». На седьмом месяце болезни при нарастании явлений бульбарного паралича наблюдался летальный исход. Диагноз: хронический КЭ, полиоэнцефаломиелит, кожевниковская эпилепсия.

Вирусологические исследования. При заражении обезьян интрацеребрально штамм 41/65 вызывал острый энцефалит с инкубационным периодом 2-7 дней и летальным исходом до 11-го дня наблюдения. Наибольшее содержание вируса отмечалось в тканях головного и спинного мозга, а также печени и почек. Инфекция протекала бессимптомно при заражении обезьян под кожу, а также при 2-кратном введении циклофосфана. Несмотря на это, на 5-6 дни после заражения в ткани ЦНС и почки удалось обнаружить вирус КЭ. В последующие сроки установлена персистенция вируса КЭ [Погодина В.В., 1981–1986]. Изоляты персистирующего штамма 41/65 обладали патогенностью для мышей, вызывали ЦПД в культуре СПЭВ и образовывали бляшки диаметром 1,2-2,5 мм. В реакции бляшкообразования штамм 41/65 проявил высокую активность, титр вируса $0,6 \times 10^8$ БОЕ/мл. В опытах на сирийских хомяках инфекция в основном протекала субклинически, процент гибели составлял 16,6% при СПЖ, равной 122,4 дней.

Генотипирование штамма 41/65. Генотипирование штамма 41/65 проведено методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. При обработке ампликонов генотипирующими эндонуклеазами рестрикции был

получен набор последовательностей ДНК, длины которых соответствовали сибирскому субтипу вируса КЭ. Также для штамма 41/65 определена последовательность нуклеотидов Е-гена (AY363852, GenBank). Штамм отнесен к сибирскому субтипу вируса КЭ. На дендрограмме штамм 41/65 находится в подгруппе штаммов сибирского субтипа и принадлежит к другому кластеру, нежели прототипные штаммы Айна и Васильченко, и близок к штамму Заусаев [Погодина В.В. и др., 2004].

Штамм 592 изолирован от больной Л-вой, 21 года. По данным А.П. Иерусалимского (2001), максимальный срок наблюдения больных с кожевниковской эпилепсией составлял 15-25 лет, однако данный случай уникален по продолжительности наблюдения за больной (50 лет от начала заболевания и свыше 30 лет после вакцинотерапии). Пациентка Л-ва отметила присасывание клещей 18.05.1966 г., почувствовала сильную головную боль, было носовое кровотечение, эпизод потери сознания, после чего больную госпитализировали в конце августа 1966 г. с диагнозом: менингоэнцефалит. Через 6 мес. после начала заболевания возникли миоклонусы в мышцах левых конечностей, эмоциональная лабильность, эпилептиформные приступы, галлюцинации, левосторонняя гемигипестезия, вялый парез левой стопы, парез взора вверх, птоз. В течение 2 лет наблюдалась потеря речи. Осенью 1967 г. Р.А. Мейерова (Иркутск) диагностировала ХКЭ, прогрессивное течение в форме полиоэнцефаломиелита и кожевниковской эпилепсии. Из ликвора изолировали вирус КЭ, штамм № 592 на фоне присутствия в ликворе и сыворотке крови вируснейтрализующих антител в высокой концентрации (lg ИН 3,8-4,5) [Краминская Н.Н. и др., 1972]. В феврале 1982 г. в клинике Института полиомиелита и вирусных энцефалитов был проведен один курс специфической вакцинотерапии в сочетании с внутривенным введением преднизолона. Отмечена стабилизация процесса в течение 10 лет, но в 1992 г. произошло дальнейшее прогрессирование ХКЭ. Через 16 лет от начала заболевания (до вакцинотерапии) в стадии прогрессирования ХКЭ у больной выявляли специфические антитела: антигемагглютинины к сибирскому и дальневосточному субтипам вируса КЭ и нейтрализующие антитела более высокого уровня к сибирскому субтипу. Сыворотки крови, взятые через 46-48 лет от начала заболевания и на 30-32-й годы после вакцинотерапии, при исследовании методом ИФА не содержали IgM и имели IgG в титре 1:800 с высокой степенью avidности. Титр антигемагглютининов (1:100) превышал обычные показатели, регистрируемые в стадии стабилизации ХКЭ. Сыворотка больной нейтрализовала 10^5 ТЦД₅₀ сибирского субтипа вируса КЭ.

Н.Н. Краминской и соавт. (1972) изучены свойства штамма 592, выделенного от пациентки Л-вой в 1967 г. Штамм обладал высокой нейровирулентностью и нейроинвазивностью для белых мышей. В опытах на сирийских хомьяках штамм 592 проявил умеренную вирулентность, вызывая гибель 29,2% животных при СПЖ, равной 85,9 дням. Генотипирование методом real-time PCR и секвенирование гена Е показали принадлежность штамма к сибирскому субтипу вируса КЭ. При анализе нуклеотидной последовательности выявлено, что штамм 592 находится в одном кластере со штаммами, изолированными в 1963–1965 гг. на территории Иркутской области от больных хроническими формами КЭ.

Из числа генотипированных штаммов, изолированных от больных ХКЭ без предшествующего острого периода и закончившихся летальным исходом, известен лишь один штамм – *Заусаев (Za)*. Данный штамм был изолирован в лаборатории клещевого энцефалита и других вирусных энцефалитов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов (Москва) от умершего больного с прогрессирующим на протяжении 2-х лет ХКЭ, который развился после латентного периода, равного 10-ти годам, с момента присасывания клеща в Томской области [Фролова Т.В. и др., 2008а]. Обращает на себя внимание серонегативность по показателям гуморального и клеточного иммунитета. Секвенирован полный геном штамма, показавший принадлежность штамма Заусаев к сибирскому субтипу вируса КЭ [Gritsun T.S. et al., 2003]. Штамм Заусаев стал прототипным штаммом подгруппы азиатского топоварианта сибирского субтипа.

ХКЭ, вызванный микст-штаммом вируса КЭ. Штамм 45/69 выделен от больной Ф., 33 лет, которая отрицала присасывание клещей, считала себя больной с 1955 г. В 1958 г. после эмоционального стресса возникли фокальная мышечная дистония шеи (спастическая кривошея), гиперкинезы, блефароспазм, гипертонус мышц правой руки с одновременной атрофией дельтовидной мышцы, парез мышц языка с фибриллярными подергиваниями. Из ликвора был выделен штамм 45/69 вируса КЭ [Краминская Н.Н. и др., 1972], что подтвердило диагноз КЭ. В 1976 г. симптоматика КЭ регрессировала, сохранялась лишь атрофия дельтовидной мышцы справа. Пациентка продолжала работу в прежней профессии, в 1974 г. без осложнений перенесла грипп. Умерла в 1979 г. от рака желудка. В клетках СПЭВ вирус накапливался до титра 10^8 - 10^{10} БОЕ/мл. По результатам опыта с заражением сирийских хомяков штамм 45/69 отнесен к группе высоковирулентных. Он вызывал летальный исход у 100% животных при СПЖ, равной 7-10 дням.

Штамм 45/69 был генотипирован методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Анализ показал, что после обработки ампликонов генотипирующими рестриктазами были получены последовательности, характерные как для сибирского, так и для европейского субтипов вируса КЭ [Безрукова Е.Г., 2009].

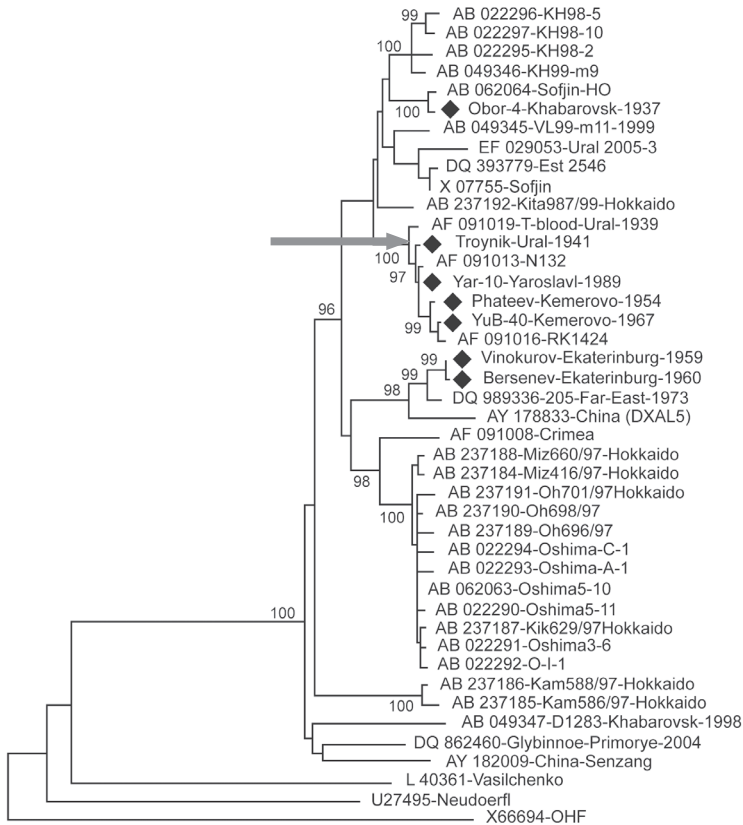
Штамм Тройник относится к первым штаммам вируса клещевого энцефалита, описанным М.П. Чумаковым при хроническом течении болезни [Чумаков М.П., 1944]. Выделен от больного Т. 6-ти лет, который заболел 27.05.1940 г. Диагноз: ХКЭ, кожевниковская эпилепсия.

Вирусологические исследования. Из крови, взятой через 1 месяц и 1 день после начала заболевания у больного Т., М.П. Чумаковым был выделен штамм Тройник. Штамм был лиофилизирован в 1941 г., в 2006-2008 гг. восстановлен в пассажах на белых мышах. Штамм Тройник проявил высокую цитопатогенную ($\lg 9,76$ ТЦД₅₀/мл) и бляшкообразующую (1×10^8 БОЕ/мл) активность. Титр гемагглютинирующего антигена в культуральной жидкости был 1:8. При интрацеребральном заражении штаммом Тройник белых мышей инкубационный период составил 4-5 дней. Штамм проявил высокую вирулентность для сирийских хомяков: наступала гибель 100% животных при СПЖ, равной 9,3 дням.

Генотипирование штамма Тройник. Штамм Тройник прошел генотипирование методом гибридизационно-флуоресцентной детекции с генотипспецифи-

ческими зондами [Карань Л.С. и др., 2007, 2010]. По его результатам штамм Тройник отнесен к дальневосточному субтипу вируса КЭ. При анализе нуклеотидной последовательности гена белка Е уровень гомологии со штаммом Софьин составил 94,1%. Расположение штамма Тройник на дендрограмме среди других штаммов дальневосточного субтипа показано на схеме.

Схема. Расположение штамма Тройник на дендрограмме на основе нуклеотидной последовательности белка Е вируса клещевого энцефалита [Карань Л.С. и др., 2007].



Штамм Хромов. Хромов, 47-летний артиллерист, заболел остро 13.05.1943 г. Лихорадочный период продолжался 10 дней. Спустя 4 месяца после начала заболевания неврологический дефицит усугубился. На пятый месяц болезни, 05.10.1943 г., начали развиваться и нарастать новые неврологические симптомы коркового, подкоркового и стволового происхождения.

При явлениях нарастающей сердечной недостаточности больной скончался 09.11.1943 г. через 6 месяцев после начала заболевания. Диагноз: хронический рецидивирующий клещевой полиоэнцефаломиелит, летальный исход.

Ретроспективно два штамма, выделенные из мозга и крови Хромова, были типированы методом гибридационно-флуоресцентной детекции с генотип-специфическими зондами и отнесены к дальневосточному субтипу вируса КЭ.

Штамм 3/65 изолирован от больного Р-ва О. 24 лет. В феврале 1963 г. стал отмечать головные боли, преходящее онемение и слабость левой руки. В мае 1963 г. во время работы в лесу возникли тонические судороги стоп с явлениями карпопедального спазма и опистотонусом. Наблюдались тикообразный гиперкинез левой половины лица и подергивания конечностей с распространением судороги при волнении на мышцы туловища. Ликвор в это время был нормальным, результат РСК с вирусом КЭ – отрицательный, поэтому диагноз КЭ был снят, пациент выписан с диагнозом хронического энцефалита без указания этиологии. В ноябре 1964 г. появились преходящие парестезии уже в правой руке, наблюдались два генерализованных эпилептиформных приступа. В декабре 1964 г. определялся двусторонний птоз, паралич взора вверх, слабость конвергенции, амимия и подергивание мышц лица, парез XI и XII черепномозговых нервов справа, моторная афазия, гипертонус мышц по экстрапирамидному типу с симптомом «зубчатого колеса», атаксия, хореическая походка. Диагноз: ХКЭ, менингоэнцефалит.

Вирусологические исследования. При заражении сирийских хомяков штамм 3/65 проявил себя как высоковирулентный: вызывал летальный исход у 67-100% животных при СПЖ, равной 5-10 дням. Штамм 3/65 генотипирован при помощи рестрикционного анализа и секвенирования по Е-гену и отнесен к сибирскому субтипу вируса КЭ.

Таким образом, была доказана этиологическая роль 20-ти штаммов в развитии хронических форм КЭ с использованием различных методов: иммунологических (РДПА) и высокоточных молекулярно-генетических (real-time PCR, секвенирование фрагментов и полноразмерного генома с определением кластерной принадлежности). Заболевание развивалось как по инициально-прогрессирующему, так и по раннему, позднему или спонтанно прогрессирующему типу течения. Были изучены свойства данных штаммов. В реакции бляшкообразования все штаммы, выделенные от больных ХКЭ, проявляли высокую активность, давали популяцию бляшек размером до 3 см. Все штаммы обладали высокой нейроинвазивностью в опытах на белых мышах, умеренной или высокой вирулентностью для сирийских хомяков и высоким патогенным потенциалом. При заражении сибирским субтипом вируса КЭ сирийских хомяков наблюдалось пролонгированное течение экспериментальной инфекции. Штаммы как дальневосточного, так и сибирского субтипов вируса КЭ показали способность вызывать летальные исходы (штамм 41/65, сибирский субтип и штамм Хромов, дальневосточный субтип). Выделение микст-штамма от больной ХКЭ (штамм 45/69) впервые показало роль микст-штаммов и штаммов европейского субтипа вируса КЭ в этиологии хронических форм клещевого энцефалита. Болезнь при заражении микст-штаммом вируса КЭ имела затяжное, вялое течение с постепенным регрессом клинической симптоматики. По результатам генотипирования молекулярно-генетическими методами большинство изученных штаммов отнесены к сибирскому субтипу вируса КЭ.