Институт средств медицинской диагностики
ЗАО «Вектор-Бест»

А.Д. Аммосов

КЛЕЩЕВОЙ ЭНЦЕФАЛИТ

Информационно-методическое пособие

Кольцово
2006

Обзор литературы по клещевому энцефалиту посвящен преимущественно молекулярно-вирусологическим, медико-вирусологическим аспектам и патогенезу распространенной инфекции, краткому рассмотрению современных методов и средств ее диагностики, профилактики, этиотропного лечения и предназначен для врачей и других специалистов инфекционных клиник, больниц, вирусологических лабораторий, а также для научных работников, занятых проблемой природно-очаговых нейровирусных инфекций.

1. ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

Открытие вируса клещевого энцефалита и начало всестороннего изучения этиологически связанной с этим вирусом нейроинфекции клещевого энцефалита составляют замечательные и одновременно драматические эпизоды истории отечественной медицинской вирусологии. Эпидемия весенне-летнего клещевого энцефалита была подтверждена и ее комплексное исследование начато на Дальнем Востоке экспедициями Наркомздрава бывшего СССР в 1937–1939 гг. В составе экспедиций вместе с вирусологами и инфекционистами из центра работали местные клиницисты-неврологи, хорошо знакомые с характерной нейропатологией в регионе.

Из мозга и ликвора умерших от тяжелой острой формы энцефалитных больных, в анамнезе которых часто упоминался укус лесного клеща, вирусологами был выделен и впервые охарактеризован ранее неизвестный вирус клещевого энцефалита (ВКЭ). Немедленно были начаты исследования роли клещей в передаче природно-очаговой инфекции, пути циркуляции вируса и его природного резервуара. По единой программе комплексно изучались этиология, эпидемиология, клиника, иммунология и патоморфология ВКЭ-инфекции, началась разработка методов ее диагностики, лечения и вакцинопрофилактики.

Во время этих работ среди немалого числа тяжелых больных и умерших от клещевого энцефалита были и сотрудники научных экспедиций. В 1937 г. при вскрытии умершего больного один из первооткрывателей ВКЭ М.П. Чумаков заразился клещевым энцефалитом и перенес энцефалополиомиелит. Острая инфекция со временем перешла в хроническую болезнь, которая протекала пожизненно до 1993 г. Еще во время экспедиции М.П. Чумаков показал возможность культивирования ВКЭ в тканевых фрагментах, и позже, в 1944 г., также впервые выделил вирус из крови хронического больного клещевым энцефалитом (кожевниковской эпилепсией). Несмотря на тяжелую болезнь с поражениями слуха и шейной, правой плечевой зоны мозга, а в дальнейшем в конце 80-х годов с прогрессированием двигательных нарушений, акаде-

мик М.П. Чумаков сохранял огромную трудоспособность и высокий интеллект. По его завещанию было проведено уникальное посмертное исследование его мозга в отношении хронического клещевого энцефалита, протекавшего десятилетиями после первоначального инфицирования вирусом с манифестациями острой инфекции.

Как следует из воспоминаний участников экспедиций в печати, жертвы тогда приносились не только вновь открытой таежной инфекции. В разгар работ руководитель первой экспедиции профессор Л.А.Зильбер, руководитель отряда А.Д. Шеболдаева и эпидемиолог Т.А. Сафонова были арестованы властями по ложному обвинению, что экспедиция тайно распространяла японский энцефалит на Дальнем Востоке.

В Европе клещевой энцефалит впервые был диагностирован в Чехословакии в 1948 г., и инфекция стала известна под названием центрально-европейский энцефалит. В отличие от Европы клещевой энцефалит в России назывался русским весенне-летним эпидемическим энцефалитом. Со временем, из-за общности этиологического источника, за этой широко распространенной инфекцией повсеместно утвердилось общее название клещевой энцефалит. Успешное лечение и изучение клинических особенностей клещевого энцефалита в течение многих лет проводились А.Г. Пановым, А.Н. Шаповалом, А.А. Смородинцевым, А.П. Иерусалимским и др. В изучение молекулярной биологии, генотипирование ВКЭ, в исследования глубоких связей между гетерогенностью генома природного клещевого пула вируса и вирулентностью, патогенезом, клиническими и эпидемиологическими особенностями природно-очаговой нейровирусной инфекции клещевого энцефалита, а также в разработку ПЦР-анализа возбудителя инфекции значительный вклад был сделан благодаря расшифровке первичной нуклеотидной последовательности полного генома и аминокислотной последовательности полипротеина ВКЭ, впервые проведенной А.Г. Плетневым, В.Ф. Ямщиковым и В.М. Блиновым. Другим значительным событием в этих исследованиях стали получение и изучение C.W. Mandl, F.X. Heinz, C. Kunz, H. Holzmann, Е.К. Прессманом, Н.А. Цехановской, Л.Э. Матвеевым, А.А. Кущ и др. авторских серий моноклональных антител к основным антигенам этого вируса и применение их в качестве лабораторного инструмента высокого разрешения для исследований иммуногенных, патогенных и других функциональных свойств структурных и неструктурных белков ВКЭ, для диагностики инфекции.

Дальнейшее изучение клеточно-гуморального иммунитета, сложного иммуно- и нейропатогенеза висцерально-невральной инфекции и их связи с генетической неоднородностью возбудителя инфекции и наследуемыми особенностями системы иммунитета пациента наравне с современными клиническими исследованиями острого и хронического клещевого энцефалита составляют научную основу новых разработок методов и средств профилактики, диагностики и лечения этой актуальной для здравоохранения природно-очаговой нейровирусной инфекции.

2. ЭТИОЛОГИЯ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ИНФЕКЦИИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

2.1. Возбудитель инфекции и его переносчики в природе

Клещевой энцефалит или, по международному классификатору заболеваний МКБ-10, энцефалит весенне-летнего типа (таежный) – вирусная инфекция, поражающая оболочку, серое и белое вещество и другие отделы головного и спинного мозга ЦНС, корешки спинномозгового нерва и периферические нервы, приводящая к развитию парезов и параличей. При клещевом или алиментарном заражении вирусом входными воротами организма человека служат кожа и подкожная клетчатка или клетки эпителия пищеварительного тракта откуда вирус распространяется в организме по кровеносным, лимфатическим и (или) невральным путям, инфицирует клетки крови, органы иммунной системы, другие внутренние органы и достигает мозга, который служит местом длительного размножения вируса и основным центром локализации патологического очага нейроинфекции. Клинически клещевой энцефалит, как правило, развивается в острой циклической форме с выздоровлением, однако, иногда со временем может трансформироваться в хроническую инфекцию. Не исключается развитие инфекции и в первично-хронической форме. Тяжелые осложнения острой инфекции (это в первую очередь территориально относится к Дальнему Востоку России) часто могут завершиться параличом и летальным исходом. Хроническая инфекция клещевого энцефалита с поражениями мозга протекает годами или пожизненно.

Природно-очаговая инфекция клещевого энцефалита этиологически связана с вирусом клещевого энцефалита из семейства Flaviviridae, экологически относящимся к арбовирусам, переносимым членистоногими. Семейство вирусов *Flaviviridae* теперь выделено из семейства *Togaviridae* и состоит из трех родов: флавивирусов (*Flavivirus*), пестивирусов (*Pestivirus*) и вирусов гепатита C и G (*Hepacivirus*) [40, 41]. Эти три группы вирусов, хотя имеют различные биологические свойства и не обладают серологической перекрестной реактивностью, похожи и родственны между собой с точки зрения морфологии вирионов, организации вирусного ге-

нома и предполагаемой стратегии репликации геномной РНК. Все три рода семейства флавивирусов одинаково характеризуются инфекционной геномной РНК, сходной локализацией генов структурных белков на 5'-конце геномной РНК, отсутствием специализированных геномных РНК, кодирующих белки вирионов, и образованием единого полипротеина-предшественника.

ВКЭ в числе тесно родственного антигенного комплекса вирусов клещевого энцефалита относится к флавивирусам и чаще всего переносится клещами вида *I. persulcatus* и *I. ricinus*. В некоторых очагах ВКЭ переносится клещами *H. concinna*, *D. silvarum*, *D. pictus* и др. Считается, что еще до 14 видов клещей являются носителями вируса в природе, но их эпидемическая роль невелика. Основным резервуаром вируса в природе являются его главные переносчики, иксодовые клещи. Врожденная инфицированность клещей поддерживает постоянный уровень вирусофорности этих насекомых. Дополнительным природным резервуаром вируса служат прокормители инфицированных клещей: многочисленные грызуны (полевая мышь, бурундук, заяц и др.), другие дикие и домашние животные, птицы. В природе вирус поддерживается постоянной циркуляцией по замкнутой цепи: клещи – животные-прокормители – клещи. Инфицирование человека для ВКЭ является биологически тупиковым направлением, поскольку вирус дальше не передается к другому организму и выходит из природной циркуляции.

Для клещевого энцефалита характерна строгая весенне-летняя сезонность начала заболевания, связанная с сезонной активностью переносчиков. В ареале *I. persulcatus* заболевание приходится на весну и первую половину лета, май–июнь месяцы, когда наиболее высока биологическая активность этого вида клещей. Однако, как утверждается [23], на юге Дальнего Востока свежеслинявшим имаго из нимф *I. persulcatus* необязательна генетически запрограммированная поведенческая диапауза, которая способствует сезонному затуханию активности природного очага с этим носителем вируса в других регионах страны. Для клещей вида *I. ricinus* отмечается подъем биологической активности дважды за сезон, и в ареале этого клеща характерны 2 пика сезонной заболеваемости клещевым энцефалитом: весной (май–июнь) и в конце лета (август–сентябрь). Инфицирование человека ВКЭ происходит во время кровососания голодных вирусофорных клещей. Кровосо-

сание самки клеща продолжается много дней, и при полном насыщении она увеличивается в весе 80–120 раз. Кровососание самцов длится обычно несколько часов и иногда остается незамеченным. Передача вируса клещевого энцефалита может происходить в первые минуты присасывания высоковирусофорного клеща к человеку. Удаление клеща при сохранении «цементирующей пробки» из содержащей вирус слюны клеща в коже человека, по-видимому, полностью не устраняет передачу инфекции.

В одном высоковирусофорном клеще может содержаться преизбыточная доза возбудителя инфекции – до 1010 вирусных частиц, из числа которых попадание в кровь человека одной миллионной доли вирусного пула может быть достаточно для развития инфекции. Численность клещей во многих очагах Дальнего Востока и Сибири в среднем достигает 50–70 экз. на 1 км пешеходного маршрута, при индивидуальной зараженности (вирусофорности) клещей в естественных (диких) природных очагах от 2 до 15%. Уровень вирусофорности отдельного клеща зависит от его возраста и степени напитанности. Максимальное содержание вируса устанавливается у клещей предельных физиологических возрастов. Низкий уровень вирусофорности у клеща наблюдается в фазе перехода его к активному состоянию. Доля клещей с высоким содержанием вируса среди напитавшихся особей значительно выше, чем у голодных сородичей. На основании этого феномена предполагается возможность ускоренного размножения вируса во время и после питания клеща. Концентрация вируса в *I. persulcatus*, напитавшихся на больных мышах, непрерывно возрастает, достигая максимума к 40 дню. За этот период количество вируса возрастает в 1000 раз. В отличие от очагов инфекции в таежных территориях, в антропургических очагах ВКЭ-инфекции зараженность клещей вирусом достигает высоких показателей: 24,5% – в Пермской области; 34,7% – в Кировской области; 57,8% – в Новосибирской области. При этом вирусофорность клещей по непонятной причине подвержена иногда очень резким межгодовым колебаниям в 2–3 раза [1].

Типичными ландшафтами природных очагов инфекции оказываются лиственные и смешанные хвойно-лиственные леса с выраженным подлеском и высоким травостоем, пойменные луга по берегам рек, берега озер и прудов, лесные просеки, придорожная растительность, лесные тропинки, создающие условия для частого нахождения прокормителей клещей. Прокормителями половозре-

лых клещей служат крупные виды животных, а для нимф и личинок – мелкие мышевидные грызуны.

Заболевание в Европе и Сибири протекает в более легкой форме, чем в восточной части ареала, особенно на Дальнем Востоке. Это дало основание впервые различить западный и восточный типы клещевого энцефалита и, соответственно, их возбудителей. Возбудитель инфекции повсеместно принадлежит к одному виду вируса комплекса клещевого энцефалита флавивирусов и, тем не менее, клещевой пул вируса на каждой территории, как стало известно со временем, состоит из смеси штаммов, различающихся генетически и серологически. Штаммы ВКЭ варьируют и по вирулентности, однако, долго не было убедительных данных по корреляции между вирулентностью и антигенными особенностями вируса. Некоторыми исследователями отмечалась большая разница в патогенности и антигенных свойствах штаммов вируса, выделенных из *I. persulcatus* и *I. ricinus*. Другие не обнаруживали строгой зависимости между географией очага, видовыми различиями переносчиков и циркуляцией определенных вариантов вируса и их патогенностью [2]. При этом известно, что летальность в Европейской части России в разные годы до последнего времени исчислялась в 1–3%, а на Дальнем Востоке роковые исходы наступали у 12–25% заболевших клещевым энцефалитом. Более того, широко известны низковирулентный вирус из комплекса вирусов клещевого энцефалита Лангат, аттенуированный культуральный штамм Еланцев ВКЭ, кандидаты для производства живых вакцин в прошлом, производственный штамм 205 для получения инактивированной вакцины и выскопатогенный дальневосточный штамм Софьин ВКЭ и др., выделенные в разных местах циркуляции вируса в разное время.

Заражение человека клещевым энцефалитом происходит не только при укусе клещами. Также наблюдается алиментарный путь заражения при употреблении сырого, содержащего вирус молока инфицированных коз и коров. Однако, в настоящее время доля этого пути в заражении людей, по сравнению с трансмиссивной передачей ВКЭ-инфекции, незначительна.

2.2. Распространенность клещевого энцефалита

Инфекция клещевого энцефалита распространена по всей лесной и лесостепной умеренной климатической зоне Евразийского континента. Природные очаги этой инфекции имеются во всех странах

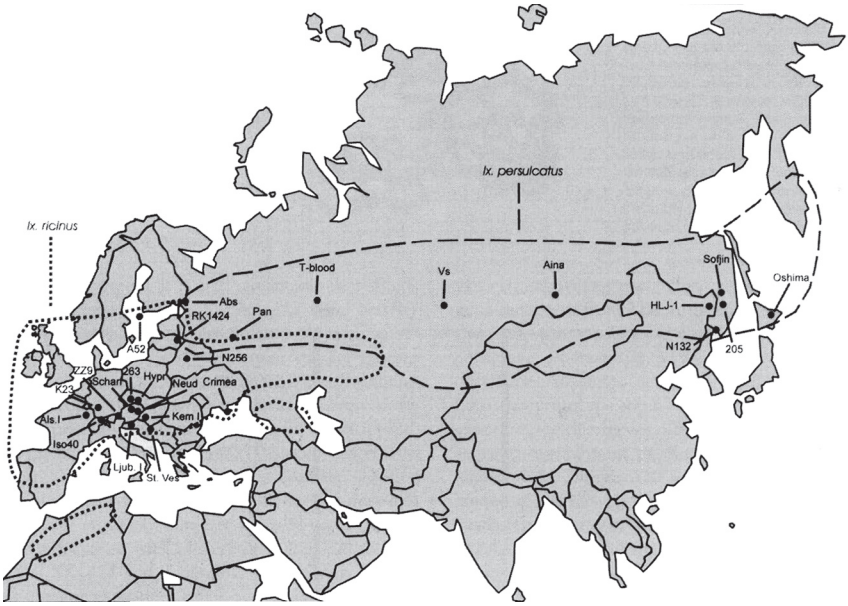

Рис.1. Географические зоны распространения иксодовых клещей, основных носителей ВКЭ.
I.persulcatus * – штриховая линия. *I.ricinus* – пунктирная линия. Показаны места изоляции штаммов ВКЭ, изученных в работе [43].

западной, центральной, восточной и отчасти северной Европы, в частности, на Британских островах, во Франции, Германии, Швеции, Австрии, Чехии, Словакии, Венгрии, Польше, прибалтийских странах. В Российской Федерации, где заболевание широко распространено, высокоэндемичными районами являются средний и южный Урал, юг Западной и Восточной Сибири, Дальний Восток (Приморский край). Очаги клещевого энцефалита распространены в Монголии и в северных провинциях Китая. Самый восточный природный очаг клещевого энцефалита выявлен на острове Хоккайдо в Японии. Совсем недавно, в 1995 г., там был диагностирован первый случай тяжелого клещевого энцефалита. На рис. 1 представлена карта повсеместного распространения вируса клещевого энцефалита с указанием раздельных зон, образуемых двумя основными видами клещей-переносчиков этой инфекции [43].

Географические зоны распространения клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus* на этой карте достаточно хорошо совпадают (за исключением Кавказа, Крымского и Апеннинского полуостровов, части Западной Европы и островов Великобритании) с картами распространения этих клещей, ВКЭ и заболеваемости клещевым энцефалитом, опубликованными ранее А.Н. Шаповалом в 1980 г. [53] и Э.И. Коренбергом и Ю.В. Ковалевским в 1981 г. [52]. Отсюда можно делать вывод о расширяющемся ареале распространения иксодовых клещей, носителей ВКЭ, и, по-видимому, соответствующем расширении территорий заболеваемости клещевым энцефалитом в мире в последнее время.

Показатель заболеваемости клещевым энцефалитом на 100 тыс. населения в России постоянно растет в течение многих лет и достиг величины 6,7 в 1999 г. Однако, средний показатель по стране мало что говорит о высоком уровне распространенности инфекции в некоторых регионах страны. Во многих высокоэндемичных районах этот показатель в 1998 г. был равен: в Республике Удмуртия – 53,5, в Томской области – 39,2, в Красноярском крае – 37,0, в Новосибирской области – 19,6, в Иркутской области – 12,5, в Приморском крае – 9,8. Всего в 1998 г. в Российской Федерации было зарегистрировано 7520 больных клещевым энцефалитом, и из них у 118 человек наступил летальный исход. Основная масса заболеваний приходится на Уральский, Западно-Сибирский и Восточно-Сибирский регионы. В этих регионах регистрируется 93% всех случаев заболевания клещевым энцефалитом в Российской Федерации. В последнее время заболевания клещевым энцефалитом стали выявляться и среди населения ранее благополучных по этой инфекции Пензенской, Ярославской, Магаданской, Камчатской областей и других территорий. Впервые зарегистрированы больные клещевым энцефалитом в Московской, Ивановской областях [26]. Численность хронических больных клещевым энцефалитом официально до сих пор не регистрируется.

Из общего числа заболевших клещевым энцефалитом до 75–80% больных составляют жители городов, заражение которых происходит в антропургических очагах (пригородной зоне) во время поездок по бытовым причинам, связанным со сбором грибов, ягод и работой и отдыхом на природе, дачных участках. Присасывание клещей на человека может происходить не только в лесу, но и в домашних условиях. Клещи заносятся в дом на рабочей одежде, с

домашними животными, букетом полевых цветов и т.д. Отмечается переползание клещей среди пассажиров городского транспорта. В последнее время рост заболеваемости клещевым энцефалитом в России связан, возможно, не только с ростом численности неиммунного населения городов, часто контактирующего с природой, а также в какой-то степени объясняется и ростом показателей зараженности клещей вирусом. Имеется предположение о том, что рост заболеваемости клещевым энцефалитом может быть связан также с ростом вирулентности клещевого пула ВКЭ в отдельных очагах инфекции.

3. ПРОЯВЛЕНИЯ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ЕГО ПОСЛЕДСТВИЯ

3.1. Острая инфекция [2, 3, 17, 18, 53]

Инкубационный период при первичном инфицировании ВКЭ составляет 8–23 дня (чаще 10–12 дней). Изредка наблюдаются продромы: слабость, недомогание, головная боль, тошнота, нарушения сна. Отмечаются скоропреходящая слабость в конечностях, мышцах шеи, онемение кожи лица и шеи. Клинические проявления клещевого энцефалита многообразны, течение вариабельно. Болезнь часто начинается остро, с озноба и повышения температуры тела до 38–40°С. Лихорадка длится от 2 до 10 дней. Появляются общее недомогание, резкая головная боль, тошнота и рвота, разбитость, утомляемость, нарушения сна. В остром периоде отмечаются гиперемия кожи лица, шеи и груди, слизистой оболочки ротоглотки, инъекция склер и конъюнктив. Беспокоят боли во всем теле и конечностях. Характерны мышечные боли, особенно значительные в группах мышц, в которых в дальнейшем обычно возникают парезы и параличи. Иногда им предшествуют онемение, парестезии и другие неприятные ощущения. С момента начала болезни может возникать помрачнение сознания, оглушенность, усиление которых может достигать степени комы. Обычно характерна разной степени оглушенность (сопор). Тем не менее болезнь часто протекает в легких, стертых формах с коротким лихорадочным периодом.

В типичных случаях острый период клещевого энцефалита продолжается 6–8 дней, но иногда – от 3 до 14 дней. Нередко в месте присасывания клещей появляются разного размера эритемы. Однако, так называемая мигрирующая кольцевая эритема часто является клиническим маркером другой инфекции – клещевого боррелиоза или болезни Лайма, также переносимой клещами. У больных клещевым энцефалитом отмечается снижение секреторной функции желудка, антитоксической, поглотительно-экскреторной, углеводной, белокобразующей функций печени. Наблюдается лихорадочная альбуминурия. В периферической крови отмечается умеренный лейкоцитоз и увеличенная СОЭ.

С первых дней течение острого клещевого энцефалита носит токсико-инфекционный характер. Симптоматика складывается из трех основных синдромов: общего инфекционного, менингеального и очагового поражения нервной системы. Несмотря на многообразие проявлений острого периода клещевого энцефалита, в каждом отдельном случае можно выделить ведущий синдром болезни. Исходя из этого, а также учитывая выраженность и стойкость неврологических симптомов, выделяют три основные клинические формы болезни: лихорадочную, менингеальную и очаговую менингоэнцефалитическую. Дополнительно могут диагностироваться менее распространенные полиомиелитическая и полирадикулоневротическая формы, утяжеление клинической картины заболевания, особенно очаговых форм болезни с появлением крайне тяжелых синдромов многоуровневого поражения ЦНС в виде энцефало-полиоэнцефаломиелитического и др.

Лихорадочная форма болезни характеризуется благоприятным течением с быстрым выздоровлением. Продолжительность лихорадки – 3–5 дней. Основными клиническими признаками ее являются токсико-инфекционные проявления: головная боль, слабость, тошнота при слабовыраженной неврологической симптоматике. Показатели ликвора – тканевой жидкости, которая омывает головной и спинной мозг в пределах гематоэнцефалического барьера, – без отклонения от нормы.

Менингеальная форма является наиболее часто выявляемым проявлением клещевого энцефалита. Больные жалуются на сильную головную боль, усиливающуюся при малейшем движении головы, головокружение, тошноту, однократную или многократную рвоту, боли в глазах, светобоязнь. Больные вялы и заторможены. Определяется ригидность мышц затылка, симптомы Кернига и Брудзинского. Менингеальные симптомы держатся на протяжении всего лихорадочного периода. Иногда они проявляются и при нормальной температуре. В ликворе определяется умеренное повышение содержания лимфоцитов, повышение концентрации белка. Внутричерепное давление повышено. Изменения в спинномозговой жидкости, возникшие в остром периоде болезни, могут сохраняться длительное время, даже в период выздоровления. Длительность лихорадки – 7–14 дней. Исход всегда благоприятный.

Менингоэнцефалитическая очаговая форма клещевого энцефалита протекает тяжело и дает частую летальность. Больные вялы, заторможены, сонливы, жалуются на сильную головную боль,

тошноту и рвоту. Выражены ригидность мышц затылка и симптомы Кернига и Брудзинского. Нередко наблюдаются бред, галлюцинации, психомоторное возбуждение с утратой ориентировки на месте и во времени. Могут быть эпилептиформные припадки. Судороги повторяются несколько раз в сутки, иногда развивается эпилептический статус. При менингоэнцефалитической форме характерно появление гемипарезов, подкорковых гиперкинезов, стволовых расстройств, а также очаговых поражений черепных нервов: III, IV, V и VI пар, несколько чаще VII, IX, X, XI и XII пар. Позднее может развиться кожевниковская эпилепсия, когда на фоне постоянного гиперкинеза развиваются общие эпилептические припадки с потерей сознания. При исследовании спинномозговой жидкости в остром периоде отмечается лимфоцитоз и повышенное содержание белка.

Таким образом, при тяжелой энцефалитной форме болезни ведущие очаговые симптомы поражения ЦНС выявляются на фоне общемозговых и токсико-инфекционных проявлений. После острого клещевого энцефалита очаговой формы период выздоровления длительный, до 2 лет. Развившиеся атрофические параличи мышц восстанавливаются частично.

Клинически особый вариант развития острой инфекции представляет **клещевой энцефалит с двухволновым течением**. Болезнь начинается остро ознобом, появлением головной боли, тошноты, рвоты, головокружения, болей в конечностях, нарушением сна, анорексией и наличием характерной двухволновой лихорадки. Первая лихорадочная волна продолжается 3–7 дней, характеризуется легким течением. Отмечаются слабовыраженные оболочечные симптомы без поражения черепно-мозговых нервов. Изменения в ликворе не определяются. На фоне интоксикации отмечаются вегетативные расстройства. В периферической крови – лейкопения и увеличенная СОЭ. За первой волной следует период апирексии, длящийся 7–14 дней. Вторая лихорадочная волна начинается так же остро, как и первая, температура тела поднимается до высоких значений. Больные вялы, заторможены, появляются тошнота, рвота, легкие менингеальные и очаговые симптомы поражения ЦНС. В периферической крови – лейкоцитоз, повышается содержание белка и сахара. Это качественно новая фаза болезни, и она всегда протекает тяжелее, чем первая, и длится дольше. В разные годы рецидивы лихорадочных состояний возникали на Дальнем востоке у 6–9% заболевших, в Западной Сибири – у 15–22%, в районах

Урала – у 28–50% [3, 18]. Наиболее характерные клинические особенности этого варианта клещевого энцефалита – двухволновое течение менингоэнцефалита с вполне благоприятным исходом, без наслоения очаговых двигательных поражений. Множественные случаи легких заболеваний с выраженным менингеальным синдромом и легкими энцефалитическими поражениями были выявлены и изучены в Ленинградской области и Республике Удмуртия в 50–70-х годах прошлого века. С учетом характерных клинических особенностей заболевание было названо А.А. Смородинцевым двухволновым менингоэнцефалитом и выделено как самостоятельный клинико-нозогеографический вариант клещевого энцефалита [53].

А.П. Иерусалимский в своем руководстве для врачей [1] клиническую классификацию острого периода клещевого энцефалита представляет в виде следующих семи форм: лихорадочная; менингеальная; менингоэнцефалитическая (очаговая или диффузная); полиоэнцефалитическая; полиоэнцефаломиелитическая; полиомиелитическая; двухволновое течение (с указанием формы второй волны). По мнению автора, по клиническим параметрам можно достаточно четко разделить лихорадочную форму и формы с поражением оболочек и вещества мозга. Эти последние уже менее четко можно разделить на менингеальную форму и очаговые формы. А вот все очаговые формы дифференцируются между собой очень трудно, в какой-то степени условно, по ведущему, наиболее функционально значимому синдрому.

У подавляющего большинства первично инфицированных возникают инаппарантная, субклиническая или стертая формы клещевого энцефалита. На территории Приморского края у каждого четвертого укушенного клещом выявляется инфекция клещевого энцефалита без клинических проявлений в виде продолжительной антигенемии ВКЭ в лейкоцитах и в объеме периферической крови [23]. Это основной путь «проэпидемичивания» и образования иммунитета у коренного местного населения эндемичных районов. Иногда вовремя не выявленные формы инфекции могут завершаться длительным вирусоносительством, которое может служить причиной редкого возникновения и развития так называемой первично-прогредиентной и, по-видимому, затем – первично-хронической инфекции клещевого энцефалита.

Выздоровление после перенесенного острого клещевого энцефалита происходит в зависимости от формы проявления инфек-

ции, ее тяжести. Изменения внутренних органов полностью исчезают в отдаленные сроки выздоровления.

3.2. Хроническая инфекция [1, 14, 53]

Клещевой энцефалит относится к группе острых циклических инфекций, наделенных выраженной способностью к полному освобождению от возбудителя при выздоровлении, с преимущественным формированием пожизненного иммунитета у перенесших не только манифестную, но и бессимптомную форму инфекции. Однако, у некоторых больных формирование очагового синдрома выявляется в более поздние сроки болезни спустя недели или даже месяцы после снижения температуры до нормального уровня, в периоде реконвалесценции. В подобных случаях клещевой энцефалит приобретает прогредиентный характер. В спинномозговой жидкости продолжают удерживаться изменения воспалительного характера. При исследовании крови также отмечаются умеренное увеличение СОЭ, небольшой лейкоцитоз, обычно со сдвигом ее формулы в сторону абсолютного и относительного лимфоцитоза. У части больных прогредиентная инфекция, как и в случае длительного бессимптомного вирусоносительства, постепенно трансформируется в хронический клещевой энцефалит.

Представления о хроническом клещевом энцефалите обоснованы длительной персистенцией ВКЭ у лиц, страдающих явными симптомами этой инфекции в течение ряда лет, десятилетий или пожизненно. К этим лицам часто относятся больные с клиническим диагнозом гиперкинетический синдром, кожевниковская эпилепсия, боковой амиотрофический склероз, эпидемический энцефалит, арахноэнцефалит, сирингомиелия, прогрессирующий полиэнцефаломиелит и др. Персистенция ВКЭ при этих недугах может устанавливаться иммуноферментным анализом вирусного антигена или прямым выделением реплицирующегося вируса на культуре клеток. Однако, наиболее надежным способом выявления хронической инфекции клещевого энцефалита является ПЦР-анализ вирусной РНК в исследуемых образцах крови или ткани пациента.

По клиническим данным, частота трансформации в хроническую инфекцию составляет 3–11% к общему числу заболеваний острым клещевым энцефалитом. Однако, в некоторых очагах инфекции в частоте трансформации острого энцефалита в хронический могут быть более значительные отклонения в ту или иную сторону.

4. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

4.1. Морфология и структурно-функциональные характеристики флавивирусов

Возбудитель острого и хронического клещевого энцефалита – ВКЭ – как и вирионы всех флавивирусов, имеет сферическую форму диаметром до 50–60 нм, покрытую гликопротеиновой оболочкой. Внутри внешней оболочки размещается вирусный капсид – геномный нуклеопротеиновый комплекс, покрытый коровым белком диаметром около 30 нм. В своем составе вирусная частица содержит 68% белка, 8% РНК, 17% липидов и 9% углеводов.

Неионные детергенты, такие, как тритон-Х, солюбилизируют оболочку вируса, удаляя все белки оболочки; дезоксихолат натрия снимает только бислойную мембрану внешней оболочки, оставляя коровый белок ассоциированным с нуклеокапсидом вируса. Обработка протеазами выявляет, что якорная часть гликопротеина оболочки вируса утоплена в липидном бислое. Оболочка флавивирусов защищает геном вируса от внутриклеточных протеаз, а раздетый нуклеокапсид деградируется рибонклеазами. Во внешней среде в составе мозговой суспензии на физиологическом растворе полностью собранная частица ВКЭ сохраняет жизнеспособность при комнатной температуре до 10 дней. Вирус устойчив в кислой среде, в частности, в составе желудочного сока; вирус в крови или его суспензия в белковом растворе инактивируются при 56°С в течение 30 мин. Кипячение убивает вирус в течение 2–3 мин. В глубоко замороженном виде или лиофилизированном состоянии в вакууме вирус сохраняет жизнеспособность многие годы. Благодаря бислойной липидной природе оболочки вирус чувствителен к эфиру, растворам лизола, спиртам.

Геном флавивирусов в составе нуклеокапсида представлен одной молекулой однонитчатой РНК положительной полярности общей длиной около 11 тыс. нуклеотидов, которые кодируют полипептидную цепь длиной 3,4–3,6 тыс. аминокислотных остатков (а.о.). Вирусная РНК содержит 7-метилгуанозиновый кэп на 5'-конце. Геномная РНК служит в качестве мРНК для внутриклеточного синтеза вирусных белков. Для сборки зрелого флавивируса син-

тезируются 3 вирусных структурных белка: капсидный белок С, мембранный белок М и поверхностный белок Е. Незрелые внутриклеточные вирусные частицы содержат гликозилированный белок-предшественник preM. Кроме того, в геноме флавивирусов закодированы неструктурные белки NS1-NS5, вирусная РНК-полимераза, которые обнаружены в инфицированной клетке и участвуют в репликации вируса. В геноме все белки закодированы последовательно в виде одной открытой рамки считывания. Индивидуальные белки вируса образуются в результате ко- или посттрансляционного расщепления единого вирусного полипротеина-предшественника протеазами вирусного или клеточного происхождения.

В репликативном цикле геномная РНК является инициатором инфекционного процесса и служит матрицей для создания дочерних копий.

4.2. Организация генома ВКЭ и экспрессия структурных и неструктурных вирусных белков

Нуклеотидная последовательность всего генома ВКЭ и полная аминокислотная последовательность полипротеина вируса расшифрованы Плетневым с соавторами [19]. На рис. 2 представлена

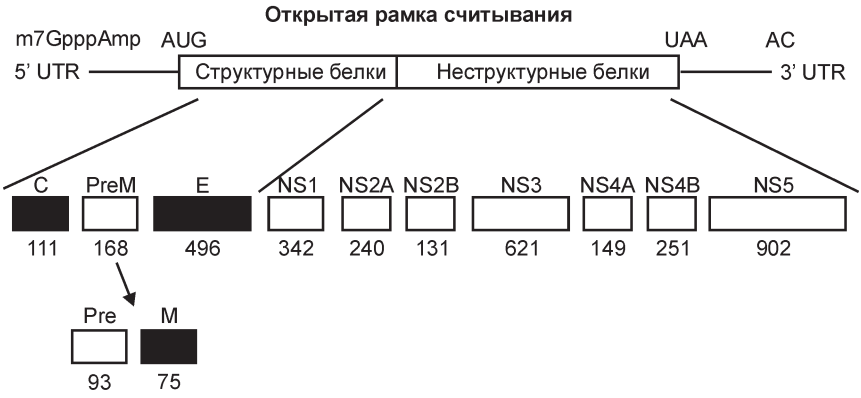

Рис. 2. Структура генома ВКЭ.
Расположение концевых нетранслируемых областей, С, PreM (Pre+M), Е и NS1-NS5 генов соответствующих структурных и неструктурных белков вируса [19].

линейная генетическая карта вируса с указанием кодируемых генов всех структурных и неструктурных белков и концевых нетранслируемых областей генома ВКЭ штамма Софьин. Этот штамм вируса выделен от больного на Дальнем Востоке еще в 1937 г., прошел несколько десятков пассажей на лабораторных животных и пермиссивных клетках. Широко известен как прототипный штамм регионального дальневосточного генетического субтипа или антигенного серотипа ВКЭ.

Немного позже были расшифрованы полная нуклеотидная последовательность генома ВКЭ западного штамма Neudoerfl (Найдорф) [25], дальневосточного штамма 205 [30] и другого вируса из антигенного комплекса ВКЭ – вируса Повассан [73].

Длина одноцепочечной РНК генома ВКЭ штамма Софьин составляет 10 477 нуклеотидов. Последовательность нуклеотидов содержит единственную открытую рамку считывания белка (поз. 127–10 363), кодирующую 3 412 а.о. полипротеина. С 5'-конца генома 126 нуклеотидов предшествуют инициирующему транскрипцию кодону AUG; затем следует открытая рамка считывания полипротеина-предшественника всех структурных и неструктурных белков вируса длиной 10 236 нуклеотидов. В другом конце полинуклеотидной последовательности геномной РНК представлены UAA-стоп кодон и 112 нуклеотидов ее 3'-нетранслируемой области.

Первым с N-концевой части полипротеина ВКЭ находится нуклеокапсидный кор-белок С, состоящий из 111 а.о. Молекулярная масса белка С равна 12 108 Da. При сборке вируса он вместе с геномной РНК образуют центральную структурную компоненту нуклеокапсида. Коровый белок обогащен остатками основных аминокислот: доля остатков аргинина и лизина, по-видимому, необходимых для нейтрализации зарядов на РНК при ее упаковке в нуклеокапсид, составляет 21,4%. Следующим от N-конца фрагментом полипротеина, выщепляемым протеазами, является гликопротеин preM-полипептид длиной 168 а.о. PreM является только предшественником в синтезе вирионного белка М, его нет в составе зрелого вириона в крови, не удается обнаружить его и в зараженных вирусом клетках. Мембранный белок М, содержащийся в составе оболочки зрелого вируса, представлен 75 остатками аминокислот, имеет молекулярную массу 8 209 Da. В С-концевой части белка находятся два гидрофобных участка, разделенных остатком аргинина. Подобные последовательности имеются в белках М всех

представителей флавивирусов. По-видимому, они обеспечивают этим белкам трансмембранную локализацию и важны для посттрансляционной модификации.

Следующим отщепляемым от предшественника полипептидом является наиболее важный поверхностный вирионный белок E. Полипептидная цепь белка E, включающая 496 а.о. с молекулярной массой 53 680 Da, заканчивается двумя гидрофобными участками, вероятно, служащими трансмембранным «якорем» белка. Белок E слабоосновный, так как 47 остатков аспарагина и глутаминовой кислоты приходятся на 50 остатков основных аминокислот. Считается, что процессинг полипротеина между белком E и неструктурным белком NS1 осуществляет связанная с мембранами аппарата Гольджи протеиназа. Структура сайта протеолиза между этими белками высококонсервативна у всех флавивирусов. С учетом вклада гликозилирования (2 % от массы белка) молекулярная масса гликопротеина E составляет 55 000 Da. В вирионном белке E гликозилирование происходит только по одному месту (поз.154 а.о.) полипептидной цепи. Нуклеотидная последовательность генов структурных белков ряда флавивирусов была опубликована ранее [20, 21].

Расщепление полипротеинов флавивирусов протеиназой со специфичностью к последовательности Val-X-Ala, расположенной на расстоянии (–3)–(–1) от места гидролиза, обеспечивает формирование N-концов белков NS2A и NS4B. По мнению авторов [19], кроме такого типа протеолиза полипротеинов флавивирусов формирование N-концевых последовательностей белков NS3, NS4A и NS5 осуществляет, по-видимому, вирусспецифическая протеиназа по последовательности, обогащенной остатками основных аминокислот, которым предшествуют протяженные гидрофобные участки полипротеинов. Функцию вирусспецифической протеиназы могут, вероятно, выполнять белки preM или NS1, так как в их составе присутствуют последовательности Cys-Trp, часто встречающиеся в активных центрах тиоловых протеиназ. Учет этих двух типов гидролиза полипротеинов флавивирусов приводит к локализации семи неструктурных белковых продуктов (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5), наблюдаемых в инфицированных флавивирусами клетках, в том числе и при репликации ВКЭ.

Низкомолекулярные белки NS2A, NS2B, NS4A и NS4B с M 24873, 14531, 16063 и 27585 Da, соответственно, – это гидрофоб-

ные белки с протяженными участками остатков незаряженных аминокислот. Функции этих молекул в развитии вируса в клетках только выясняются. Более высокомолекулярные белки NS1, NS3 и NS5 легко обнаруживаются в инфицированных флавивирусами клетках, в сыворотке крови или спинномозговой жидкости больных клещевым энцефалитом.

Нестуктурный белок NS1 (M 39162 Da) является гликопротеином и обладает иммуногенными свойствами. Комплекс белка NS1 с гликопротеином E отсутствует в зараженных клетках, несмотря на накопление индивидуальных составляющих его субъединиц, только секретируется в сыворотку крови [76]. Внеклеточная локализация комплекса на поздних стадиях инфекции исключает его участие в созревании вирионов и создает оптимальные условия для индукции синтеза вирусспецифических антител. Эти антитела способны вызвать комплемент-зависимый лизис инфицированных вирусом клеток. С другой стороны, фрагменты белка NS1 экспонируются на поверхности инфицированных ВКЭ клеток и индуцируют эффекторные CTL клеточного иммунитета. Предварительная иммунизация животных белком NS1 ВКЭ, вирусов лихорадки Денге и желтой лихорадки приводит к защите животных от высоких доз заражения этими вирусами. Однако, в сыворотке крови животных, иммунизированных NS1 ВКЭ, не обнаруживают вируснейтрализующих антител. Известно, что мутации в NS1 влияют на вирулентность флавивирусов. Предполагается, что NS1 также воздействует на ранние процессы репликации. В инфицированной клетке этот белок обнаруживается в димерной форме, либо во фракции белка с M 49000 Da. Последняя, по-видимому, представляет собой слитую форму NS1-NS2A, которая за счет гидрофобности цепи NS2A приобретает способность удерживаться на клеточных мембранах.

Второй крупный неструктурный белок NS3 (68949 Da), возможно, обладает протеазной, геликазной и рибо-НТФ-азной активностями. В составе третьего крупного неструктурного белка NS5 (102639 Da) всех флавивирусов присутствует последовательность, характерная для РНК-зависимых РНК-полимераз вирусов животных и растений: Gly-Asp-Asp. Белки NS3 и NS5, по-видимому, необходимы для репликации вирусной РНК, так как в зараженных клетках они находятся в околоядерной области в составе комплекса с репликативной формой вирусного генома. Ассоциация комп-

лекса с мембранами эндоплазматического ретикулума хозяйских клеток исключает возможность контактов с системой иммунитета и обеспечивает репродукцию ВКЭ в организме. Изменение соотношения составляющих субъединиц комплекса может вызывать переключение синтеза РНК с цепей отрицательной полярности на цепи положительной полярности [76].

Разумеется, из всех белков ВКЭ более полно изучен структурный белок Е.

4.3. Структура и функции белка Е

Белок Е – главный, биологически наиболее значимый компонент внешней поверхности оболочки вириона. Он играет ключевую роль в процессах сборки вирусной частицы, в связывании вируса с клеточной поверхностью и последующем слиянии вирусной и клеточной мембран – определяет тропизм вируса. При сборке вириона нуклеокапсид вирусной частицы диаметром 26–30 нм, состоящий из вирусной РНК и внутривирусного нуклеокапсидного белка С, заключается в липидный бислой, происходящий из плазматической мембраны клетки-хозяина и вирусных поверхностных белков preM и Е. Таким образом, гликопротеин Е и белок preM (после созревания и выхода вируса из клетки – белок М) включены в состав липопротеиновой оболочки вируса, однако, пространственно выступают на поверхности собранной вирусной частицы.

При обработке очищенного вирусного препарата трипсином или детергентами белок Е ВКЭ легко отщепляется от поверхности вириона в растворимом состоянии. Сохраняющаяся при этом интактная структура белковой глобулы была изучена рентгеноструктурным анализом [72]. На рис. 3 представлена схема пространственной конфигурации полипротеинов димера поверхностного белка Е ВКЭ. Из полученных данных следует, что на поверхности вируса белок Е представляет собой отдельную объемную единицу, состоящую из комплекса двух молекул (димера) вирусного белка Е. При этом каждая молекула белка Е в димере представляет собой продолговатое образование, состоящее из трех структурных клубков-доменов (I–III), собранное определенным образом из единой полипептидной цепочки. Объемный каркас каждой молекулы в виде трех структурных доменов белка Е жестко фиксируется шестью дисульфидными мостиками, образованными 12 цистеиновыми остатками в полипептидной цепи белковой молекулы. Абсолютная кон-

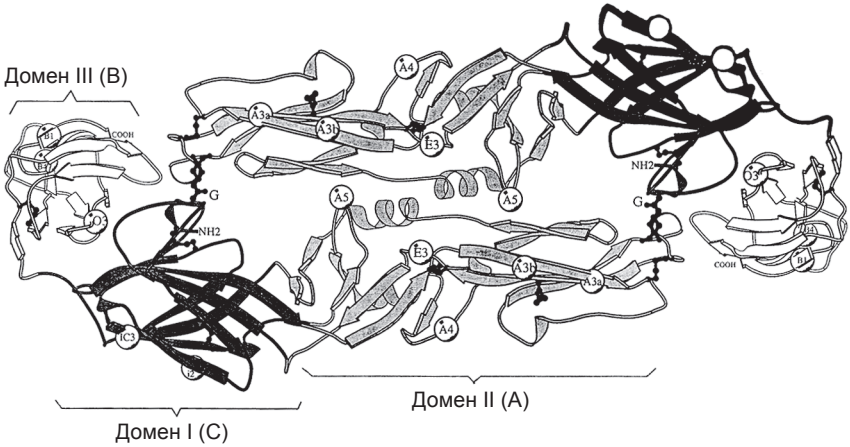

Рис. 3. Диаграмма линейной конформации полипротеиновых цепочек димера белка Е ВКЭ. Кружками показаны позиции аминокислотных замен-мутаций, ингибирующих связывание нейтрализующих вирус моноклональных антител (МКА). Дисульфидные мостики и боковые гликозильные остатки (G) в структурных доменах белка Е показаны малыми темными кружками, связанными жирными черточками. Мутации и соответствующие им МКА обозначены как в обзоре [40].

сервативность цистеиновых остатков в составе белка Е и высокая гомологичность профиля гидрофильности полипептида этого белка для всех флавивирусов предполагают одинаковую пространственную структуру поверхностного белка Е флавивирусов. Надмолекулярная димерная структура поверхностного белка вируса дополнительно поддерживается межмолекулярным взаимодействием двух объемно протяженных молекул, стянутых вместе по принципу голова-хвост или валетом. В результате получается объемная симметричная структура димера с общими размерами длиной 150Å, шириной 55Å и толщиной 30Å, где боковые поверхности в основном формируются I и II парными доменами, а торцевые поверхности – доменами III и частично I двух, образующих белковый димер, молекул. Плоская структура димера располагается параллельно с поверхностью липидной бислойной мембраны вириона, и в результате, как считается, белок Е образует на поверхности вируса объемно-решетчатую сеть толщиной 30Å.

Результаты рентгеноструктурного анализа подтверждаются данными визуализации вирионов флавивирусов методом электронной микроскопии. Выступающие на поверхности вириона свободные участки димера белка Е, состоящие из двух димерообразующих парных доменов I, II и дистальных доменов III, связывают нейтрализующие вирус иммунопротективные антитела. Не удивительно, что мутации, расположенные на поверхности димера, как будет рассмотрено ниже, могут иметь серьезные последствия в патогенезе инфекции.

С использованием набора моноклональных антител (МКА) изучены иммунохимические свойства и проведено картирование антигенных детерминант на димере белка Е. На рис. 3 показаны топологические связи, серологическая специфичность и функции отдельных эпитопов, представляемых различными клонами МКА против белка Е штамма Найдорф западного серотипа ВКЭ [15].

На основании метода конкурентного связывания МКА были определены три неперекрывающиеся антигенные домена А, В и С, каждый из которых состоит из нескольких эпитопов А1–А5, В1–В5 и С1–С6, которые проявляют различные функции и серологическую специфичность. Более того, МКА выявили три изолированных эпитопа вне антигенных доменов i1–i3. Домен А содержит не только перекрестно реагирующие между различными флавивирусами эпитопы А1 и А2, но также специфические к субтипам ВКЭ эпитопы А3 и А4. Большинство эпитопов антигенного домена В специфичны к вирусам комплекса клещевого энцефалита, тогда как домен С преимущественно содержит специфические к вирусным субтипам эпитопы. Вируснейтрализующую активность проявили МКА, соответствующие эпитопам А3, А4, А5, В1, В2, В4, В5, С1 и i2. Примечательно, что эпитопы внутри каждого антигенного домена показывали одинаковые структурные свойства: чувствительность к денатурации при низких pH, протеолизу и восстановлению дисульфидной связи. Это, несомненно, подтверждает, что антигенные домены соответствуют хорошо известным стуктурным доменам белка Е.

Семь из вышеназванных эпитопов, в которых точечные мутации замещения аминокислотных остатков ведут к потере нейтрализации вируса соответствующими МКА (escape mutations), сосредоточены в двух больших не перекрывающихся участках, антигенных доменах С и А, соответствующих пространственным доменам I и II белка Е. Антигенные домены разобщены не только

пространственно, но и отличаются по их чувствительности к конформационным изменениям и фрагментации. Оба антигенно реактивных участка вовлекаются в реакции нейтрализации вируса, но домен А содержит так называемые конформационные антигены, тогда как домен В – антигены, резистентные к конформационным изменениям и денатурации. Антигенный домен В, соответствующий структурному домену III белка Е, представляет собой достаточно автономное образование. Он может быть отщеплен от остальной части белковой молекулы трипсиновой обработкой нативного вириона или синтезирован отдельно, как генно-инженерный продукт, экспрессией рекомбинантной ДНК. Однако, в обоих случаях ведущая к нейтрализации вируса иммунохимическая активность антигенного домена В реализуется только при сохранности дисульфидного мостика внутри соответствующего структурного домена III белка Е. Как предполагается авторами, не исключено, что представленные отдельные эпитопы МКА составляют только части центров связывания нейтрализующих антител, составленных из фрагментов различных субъединиц белка на нативной структуре поверхности вириона. Хотя отсутствует специальное подтверждение, но часть центров нейтрализации вируса на белке Е, возможно, потеряна при получении солюбилизированного димера.

Локализация антигенных доменов на полипептидной карте белка Е показала, что структурный домен I образован N-концевыми 50 а.о. полипептида вместе с фрагментом 125–200 а.о., содержащим сайт гликозилирования белка Е, и другим фрагментом 250–300 а.о. Внутренние фрагменты полипептида 50–125 и 200–250 а.о. образуют домен II белка Е. Следующие около 100 (301–395) а.о. полипептида белка Е составляют структурный домен III. Последние 50 а.о. с самого С-конца полипептида составляют якорную цепочку белка Е в бислойной липидной мембране вириона.

Белок Е штамма Софьин дальневосточного генотипа и серотипа ВКЭ, по данным работы [16], образует также три функционально гетерогенных антигенных домена Е1–Е3. Еще два изолированных эпитопа не входят в домены Е1–Е3. Эпитопная карта белка Е ВКЭ штамма Минск-256 (европейский генотип) содержит два основных домена Е1, Е2, и два эпитопа изолированы от остальных. Наибольшее отличие состоит в том, что домены Е1 и Е2 перекрываются через МКА 2Н3 и 13D6, а также наблюдаются «пе-

рестановки» эпитопов 1A2 и 1H11, 14D5 и 13D6 в доменах E1 и E2, соответственно. Домен E3 и изолированные эпитопы остаются без изменений. У штамма Софьин эпитопы, участвующие в нейтрализации вируса, в доменах E1 и E2, соответственно, образуют один основной сайт. По модели Heinz у вируса штамма Найдорф все три основных домена содержат нейтрализующие эпитопы. У штамма Софьин основные эпитопы нейтрализации вируса расположены в районе 375–471 а.о. линейной карты белка E. В этом районе белка E локализованы домены нейтрализации и других флавивирусов: вируса японского энцефалита (303–396 а.о.), вируса энцефалита долины Мюррей (390 а.о.), вируса лихорадки Денге (280–414 а.о.).

Таким образом, эпитопное картирование белка E различных штаммов ВКЭ при помощи различных авторских серий МКА к этому белку, в общем случае, согласуется с выше обсуждавшимися результатами структурных исследований димерного комплекса этого белка штамма Найдорф, с трехдоменным объемным представлением о нем. Идентификация иммуноактивных участков белка E ВКЭ штамма Софьин с помощью его синтетических пептидных фрагментов показала [47, 48]: антитела к пептидным фрагментам белка E в поз.98–113 и 394–403 а.о. являются вируснейтрализующими; пептид, соответствующий а.о. белка E 35–51, является частью конформационно зависимого B-эпитопа белка E; в ряду потенциальных T-эпитопов выявлены пептиды 48–74, 90–113, 204–224, 275–302 и 377–403, иммуногенные в свободном виде без коньюгации с белком-носителем и содержащие T-хелперные эпитопы; пептиды 204–224, 275–302 и 377–403 способны эффективно связываться с противовирусной сывороткой человека и входят в состав B-эпитопов вируса; по ингибированию слияния вируса с макрофагами, липосомами и с применением МКА установлено, что полипептидный фрагмент белка E 98–113 является участком слияния ВКЭ с эндосомальной мембраной клетки-хозяина. По мнению авторов работы [15], полипептидный фрагмент 398–413 а.о. белка E ВКЭ, вирусов Западного Нила, DEN-2 и желтой лихорадки по характерному профилю своей гидрофобности соответствует иммунодоминантному T-клеточному сайту. Таким образом, белок E флавивирусов по своим структурно-функциональным свойствам определяет не только тропизм вируса, но также играет, по-видимому, во многом ключевую роль в вирулентности вируса, развитии гуморального и клеточного иммунитета.

4.4. Репликативный цикл флавивирусов

ВКЭ характеризуется широким клеточным тропизмом и может размножаться in vitro во многих клеточных линиях млекопитающих, членистоногих и птиц. Однако, не только у ВКЭ, но также у всех флавивирусов связывание вируса с поверхностью пермиссивных клеток и начальные события вирус-клеточного взаимодействия до сих пор детально не изучены. При помощи антиидиотипических антител, имитирующих гемагглютинирующие эпитопы белка Е, показано, что в качестве специфических рецепторов ВКЭ на поверхности клеток может выступить ламининовый рецептор человека [57]. Также предполагается, что в организме сорбция и дальнейшее необратимое связывание вириона с клеткой может быть опосредовано С3 компонентом комплемента, Fc детерминантой иммуноглобулинов или с участием специфических антител, когда уровни их концентрации ниже, чем нейтрализующие титры [40]. После прикрепления к клеточной поверхности вирионы флавивирусов локализуются во впячиваниях клеточной мембраны, где они подвергаются эндоцитозу с образованием эндоцитозных везикул (пузырьков). Иногда может наблюдаться и прямое слияние мембран. Детальные механизмы процессов раздевания вируса, трансляции внедренной в клетку вирусной РНК в вирусный полипротеин с процессингом протеазами в структурные и неструктурные вирусные белки, репликации вирусной геномной РНК, сборки нового нуклеокапсида и формирования зрелого, инфекционного вириона с участием клеточных компонентов и структур пока не исследованы.

Предполагаемая схема внутриклеточного жизненного цикла флавивирусов представлена на рис. 4 [41]. После стадий связывания с клеткой, эндоцитоза вирионов, слияния и расплавления мембран происходит раздевание нуклеокапсида и освобождение геномной РНК в цитоплазме. Далее следуют сложные совмещенные стадии трансляции и процессинга полипротеина (синтеза структурных и неструктурных вирусных белков) с ассоциированной с мембраной репликацией – размножением (+)- и (–)-цепей новой вирусной РНК. Затем вновь синтезированная (+)-цепь вирусной РНК комплексуется с preM, M и C-белками в вирусный нуклеокапсид. Дальнейшая сборка вириона с участием поверхностного E белка и созревание полного инфекционного вируса происходят в клеточных структурах и окончательно завершаются в процессе

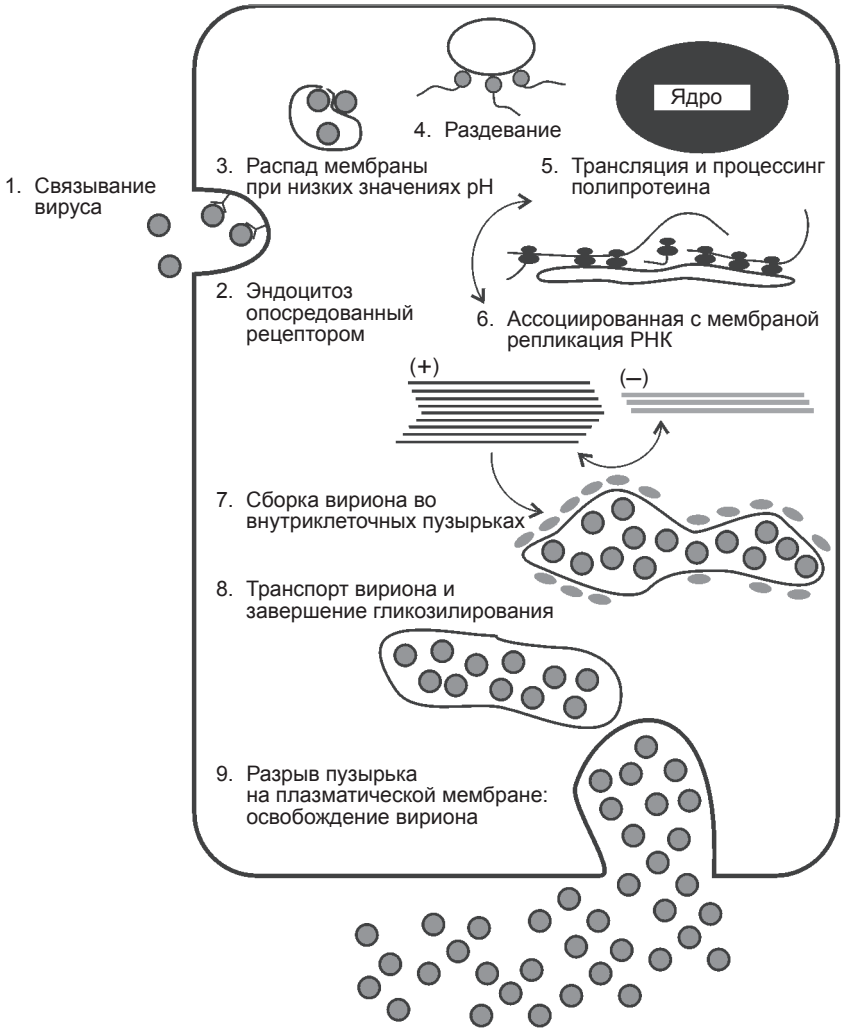

Рис. 4. Схема жизненного цикла флавивирусов [41].

транспортировки вирусов через клеточную мембрану. Вирионы созревают по мере передвижения из шероховатого эндоплазматического ретикулума в гладкий, затем в аппарат Гольджи и, наконец, в плазматическую мембрану клетки.

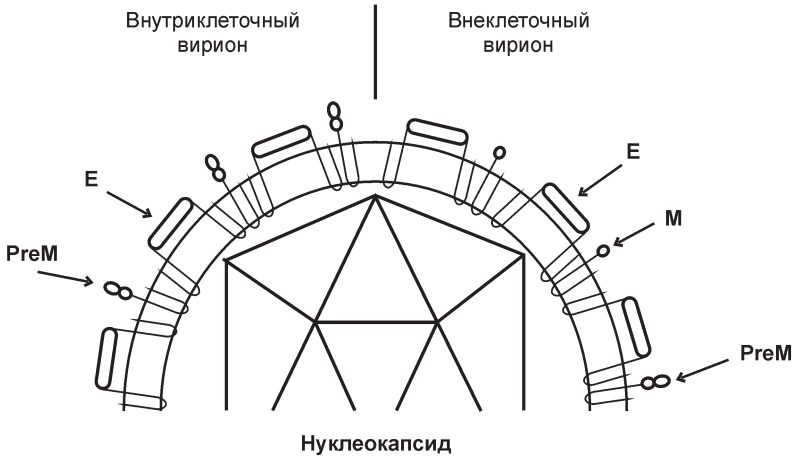

Рис. 5. Схема модификации preM белка в белок M зрелого флавивируса при транспортировании вириона через клеточную мембрану [41].

Созревание вируса с повышением его инфекционной активности также связывают с делеционным расщеплением preM белка с образованием структурного белка M зрелого вириона ВКЭ. Это расщепление встречается перед самым высвобождением вириона из клетки или одновременно с процессом транспортировки вириона через клеточную мембрану (рис. 5). Как предполагается, антитела к preM белку могут способствовать протективному иммунитету путем нейтрализации содержащих preM-антиген вирионов, находящихся на клеточной поверхности.

При инфицировании флавивирусами некоторых линий клеток позвоночных наблюдается образование дефектных вирусных частиц с неполным геномом или с нарушенным порядком расположения генов в геномной РНК, так называемых дефектных интерферирующих вирусных частиц, секретируемых в возрастающих концентрациях с ростом числа пассажей. Синтез интерферирующих частиц характерен для персистентной хронической инфекции. Как было показано, у мышиной линии, резистентной к флавивирусной инфекции, это свойство придается наличием одиночного аутосомально-доминантного локуса в геноме, названного Flv и картированного на пятой хромосоме [40,74]. В инфицированной

культуре первичных фибробластов от резистентной мыши синтез вирусной РНК ограничен, титр инфекционного вируса низок, а доля дефектных интерферирующих частиц значительна в результате только одного пассажа. Флавивирусы могут реплицироваться в организме резистентной мыши, но развитие инфекции замедлено, максимальная виремия на 3–4 порядка ниже, чем у нормальной мыши [41]. Эти эксперименты показали, что до сих пор не идентифицированный специфический хозяйский ген может драматически влиять на синтез флавивирусной РНК, на характер репликации вируса в клетке. Однако, в какой степени аналогичный механизм подавления репликативной инфекции может реализоваться в частном случае широко распространенного персистентного клещевого энцефалита у человека, пока не исследовано.

Новая информация, расскрывающая связь между механизмом репликации вируса в инфицированной клетке и патогенезом инфекции клещевого энцефалита получена Морозовой О.В. в результате изучения репликативного комплекса ВКЭ с участием клеточных и вирусных неструктурных белков NS5, NS3 и вирусной РНК. На основании полученных результатов предполагается, что РНК-зависимый синтез может регулироваться при помощи изменения состава внутриклеточного комплекса вирусных и клеточных белков. Выход белка NS5 из состава комплекса приводит к нормальному переключению синтеза с «минус»-цепей РНК на геномные РНК и, следовательно, к развитию репликативной инфекции. Уменьшение относительных количеств белка NS3 в составе ассоциированного с мембранами комплекса вирусных белков, возможно, ингибирует скорость синтеза геномных РНК, что приводит к реализации процесса медленной персистентной инфекции [76].

Клетки, инфицированные флавивирусами, кроме зрелых и дефектных вирусных частиц также секретируют медленно седиментирующие частицы с внешним размером 14 нм, состоящие из корпускулярных агрегатов Е и М белков вируса. Как показано, эти неинфекционные частицы вирусного происхождения являются эффективными иммуногенами в синтезе антител с нейтрализующими вирус, протективными свойствами.

В инфицированных флавивирусами клетках происходят хорошо заметные ультраструктурные изменения, включая вакуолизацию, пролиферацию внутриклеточных мембран. Инфекция

часто цитоцидна, хотя часть клеток сохраняется и, таким образом, становится хронически инфицированной. Даже на стадии максимальной репликации вируса значительного ингибирования синтеза клеточных макромолекул не наблюдается.

Кроме человека, ВКЭ также высокопатогенен для обезьян и белых мышей. Малочувствительны к нему кролики, морские свинки. В экспериментальной инфекции наряду с высокочувствительной и низкочувствительной моделями белой мыши и морской свинки промежуточную позицию по чувствительности к развитию нейропатологии клещевого энцефалита занимают сирийские хомячки. Из домашних животных к инфекции клещевого энцефалита восприимчивы поросята и овцы. Козы и коровы также инфициируются ВКЭ, однако инфекция часто ограничивается кратковременной вирусемией с проникновением вируса в молоко животных [2, 3, 41]. В результате нападения клещей в организме теплокровных животных развиваются специфические защитные реакции и при повторном присасывании клещей к иммунным животным у паразитов могут резко нарушаться процессы насыщения и наступить их гибель [53].

5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ НЕОДНОРОДНОСТЬ И ПАТОГЕННОСТЬ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

5.1. Генотипы и серотипы вируса

По результатам РТГА антигенные группы флавивирусов были разделены на 8 родственных комплексов или групп. Вне этих групп также к флавивирусам относится вирус желтой лихорадки. В первый из комплексов – антигенный комплекс вирусов клещевого энцефалита – входят: вирусы клещевого энцефалита, омской геморрагической лихорадки, кьясанурской лесной болезни, Louping ill (шотландского энцефаломиелита овец), Лангат, Повассан, Негиши, Карши и Royal Farm [41]. По результатам генотипирования штаммов ВКЭ штамм Вергина, считавшийся одним из штаммов ВКЭ, кластеризуется с вирусами комплекса клещевого энцефалита греческого и турецкого энцефаломиелита овец и, по-видимому, не является собственно вирусом клещевого энцефалита [78].

В ряде первых работ уровень гомологии и генетические взаимоотношения штаммов ВКЭ изучались методом генотипирования с применением двух типов зондов: кДНК-зонда, представляющего собой комплементарные копии трех фрагментов геномной РНК ВКЭ штамма Софьин в составе рекомбинантных плазмид, суммарно прекрывающих около половины вирусного генома со стороны 5'-конца, а также синтетических олигонуклеотидных ДНК-зондов длиной 18–26 нуклеотидов, комплементарных различным участкам РНК ВКЭ. Кроме того, использовали два олигонуклеотидных зонда, специфичных для западного штамма Найдорф. На основании способности РНК 143-х штаммов ВКЭ гибридизоваться с перечисленными зондами был разработан критерий отнесения каждого штамма вируса к одному из шести условно выделенных генетических вариантов вируса.

Генетическую вариабельность природных популяций ВКЭ изучали с помощью коллекции из 200 штаммов, изолированных из различных эндемичных районов бывшего Советского Союза – от Приморья на востоке до Западной Украины и Калининградской области на западе, Крыма и Киргизии на юге. Оказалось, что ус-

тановленные методом молекулярной эпидемиологии с применением ДНК-зондов те или иные варианты вируса циркулируют на разных, иногда весьма отдаленных друг от друга территориях или имеют смешанные совместные места распространения. Было показано, что штаммы, подобные прототипному штамму Софьин дальневосточного подтипа, составляли всего 16 % изученной коллекции и встречались преимущественно на Дальнем Востоке, реже – в западной части обследованного ареала и совсем редко – в Сибири и на Урале. Также выявлено, что штаммы, обладающие некоторыми геномными последовательностями, характерными для европейского штамма Найдорф, распространены на восток, по крайней мере, до территории Западной Сибири [9–13, 24, 52].

В другой работе Злобин В.И. с соавторами для генотипирования ВКЭ получали кДНК-копии фрагмента гена Е длиной 160 нуклеотидов, используя ПЦР с необходимыми специфическими праймерами. Полученные фрагменты секвенировали и оценивали уровни гомологии. При различиях нуклеотидных последовательностей между двумя штаммами в 12% и более их относили к двум разным генотипам. Анализ гомологии фрагмента гена Е 35 штаммов ВКЭ, изолированных в различных участках ареала, показал, что они могут быть разделены также на 6 генотипов [56].

В опубликованных позже работах Xeinz с соавторами генотипирование ВКЭ было проведено анализом нуклеотидных последовательностей полного гена белка Е из 1488 нуклеотидов и полных аминокислотных последовательностей белка Е 25 штаммов ВКЭ, изолированных по всей территории распространения клещевого энцефалита в Европе и Азии [43]. Были синтезированы подходящие полимеразные праймеры для амплификации гена белка Е. Амплифицированные с применением ПЦР гены Е ВКЭ всех 25 штаммов были секвенированы. Список штаммов ВКЭ, изученных путем анализа первичной нуклеотидной последовательности гена и сопоставления нуклеотидной и соответствующей аминокислотной последовательностей белка Е каждого штамма, приводится в табл. 1. Данные по нуклеотидной последовательности гена Е части штаммов ВКЭ были взяты из опубликованных работ других авторов. Географическое местоположение каждого выделенного изолята ВКЭ на евразийском континенте указано на ранее представленной карте (рис. 1). В результате филогенетического анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей вирусного белка Е авторами

Таблица 1

Штаммы ВКЭ, изученные секвенированием полного гена белка Е [43]

Географический район	Обозначение штамма	Год изоляции	Источник изолята	Ссылка на секвенирование
Alsace,Франция	Als.I	1975	I.ricinus	[43]
Karlsruhe, Германия	K23	1975	I.ricinus	[43]
Schaffhausen, Швейцария	Iso 40	1975	I.ricinus	[43]
Neudoerfl, Австрия	Neud	1971	I.ricinus	Mandle et al. (1988)
Zell/Ziller, Австрия	ZZ9	1985	I.ricinus	[43]
Lower Austria, Австрия	Scharl	1956	Мозг человека	[43]
Temelin, Чехия	263	1987	I.ricinus	Wallner et al. (1995)
Brno, Чехия	Hypr	1953	Кровь человека	Wallner et al. (1995)
Tatabanya, Венгрия	Kem 1	1952	I.ricinus	[43]
Ljubljana, Словения	Ljub.1	1993	Кровь человека	[43]
Stara Ves, Хорватия	St. Ves	Неизв.	Неизв.	[43]
Kumlinge, Финляндия	A52	1959	I.ricinus	Whitby et al. (1993)
Латвия	RK1424	1977	I.persulcatus	[43]
Минск, Беларусь	N256	Неизв.	I.ricinus	[43]
Крым, Украина	Crimea	1987	I.ricinus	[43]
Ленинградская обл.	Absettarov	1951	Кровь человека	[43]
Москва	Pan	1957	Кровь человека	[43]
Пермь	T-blood	1939	Кровь человека	[43]
Новосибирск	Vasilchenko	1969	Кровь человека	Gritsun et al. (1993)
Иркутск	Aina	1963	Кровь человека	[43]
Приморский край	205	1973	Неизв.	Safronov et al. (1991)
Приморский край	Sofjin	1937	Мозг человека	Pletnev et al. (1990)
Владивосток	N132	1979	I.persulcatus	[43]
Helongjang, Китай	HLJ	1953	Мозг человека	Hou et al. (1997)
Hokkaido, Япония	Oshima	1993	Ликвор	Takashima et al. (1997)

выявлены всего 3 генетические линии штаммов, соответствующие европейскому, дальневосточному и сибирскому субтипам ВКЭ. Филогенетическое древо происхождения вирусов трех субтипов ВКЭ

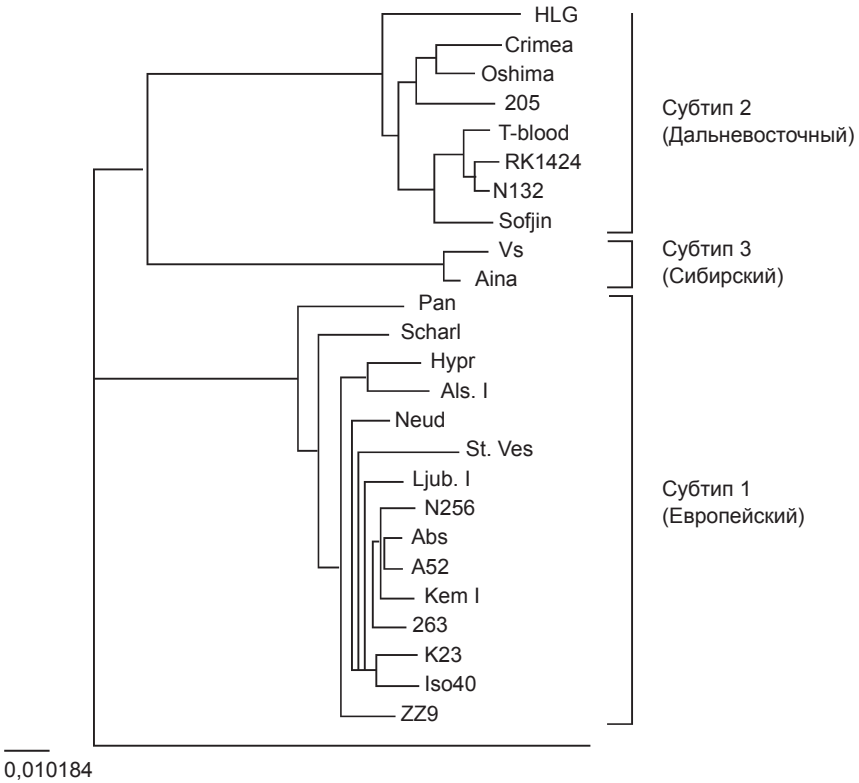

Рис. 6. Филогенетическое древо, иллюстрирующее генетические отношения изолятов ВКЭ. В качестве вируса внешней группы принят вирус Омской геморрагической лихорадки (OHF). Представлена шкала, соответствующая ожидаемому числу замен на нуклеотидный сайт [43].

иллюстрируется на рис. 6. Как установлено, степень вариации в составе аминокислотных остатков белка в пределах одного субтипа вируса незначительна и колеблется в пределах всего 2,2%. Максимальная степень расхождения в составе аминокислотных остатков белка E между субтипами вируса достигает 5,6%, что находится в пределах колебаний этой характеристики, соответствующей разнице между различными флавивирусами. На этом основании считается оправданным выделение ВКЭ в качестве самостоятельного представителя флавивирусов с тремя субтипами: европейский суб-

тип ВКЭ с прототипным штаммом Найдорф, включающий другие штаммы этого вируса из Австрии, Швейцарии, Франции, Германии, Венгрии, Чехии, Словении, Хорватии, Финляндии, Белоруссии и Европейской части России; дальневосточный субтип ВКЭ с прототипным дальневосточным штаммом Софьин, включающий другие штаммы этого вируса из Дальнего Востока, Китая, Японии и также некоторые штаммы ВКЭ из Латвии, Украины и западной части России; сибирский субтип ВКЭ с прототипным штаммом Айна, включающий штамм Васильченко и другие многочисленные восточно- и западносибирские штаммы вируса [45]. Как подчеркнуто авторами работы [43], у белка Е ВКЭ степень вариабельности аминокислотного состава (0–5,6%) значительно ниже величины вариации нуклеотидного состава (1–16,9%) в первичной последовательности его гена, и селекционный пресс эволюции вируса более однозначно фиксируется в аминокислотном составе белковой молекулы вируса. Поэтому в аминокислотной последовательности белковой молекулы легче могут быть выделены генотипически характеристические фрагменты последовательности остатков аминокислот. Например, в поз. 206 аминокислотной последовательности белка Е все три генотипа вируса представлены тремя различными неповторяющимися аминокислотными остатками, уникальными для каждого субтипа вируса: для европейского – Val, для сибирского – Leu и для дальневосточного субтипа ВКЭ – Ser. В результате, по мнению авторов [43], на основе идентификации аминокислотного остатка в поз. 206 и части других характеристических остатков белковой молекулы субтип каждого нового изолята ВКЭ из трех выявленных генотипов вируса в настоящее время может быть расшифрован не обязательно полным, а только частичным секвенированием гена Е, его фрагментов, соответствующих характерным участкам белка Е.

Согласно недавним публикациям Злобина В.И. с соавторами, эти 3 субтипа ВКЭ могут быть установлены также на основе анализа первичной структуры или уровней гомологии фрагмента гена белка Е [77, 78]. Генотипирование ВКЭ с получением аналогичных результатов может быть проведено и методом гибридизации нуклеиновых кислот с применением молекулярных зондов, составленных из олигонуклеотидов длиной 18–22 оснований, комплементарных фрагментам РНК, кодирующим белок Е прототипных штаммов ВКЭ [79]. При этом штаммы ВКЭ, отнесенные в

выше цитированных ранних работах Злобина В.И. с соавторами к генотипам 4 и 5 на основании степени их отличий в гомологии нуклеотидных последовательностей от штаммов генотипа 1, 2 и 3, в результате сравнения выведенных соответствующих аминокислотных последовательностей фрагмента белка Е в новых работах этих авторов отнесены к генотипам 2 и 3. Штамм Вергина, ранее отнесенный генотипу 6, примыкает к вирусам турецкого энцефаломиелита овец, греческого энцефаломиелита коз и, по-видимому, является не вирусом клещевого энцефалита, а относится к вирусам антигенного комплекса клещевого энцефалита.

Насколько полно установленные в настоящее время три субтипа ВКЭ – европейский, дальневосточный и сибирский – представляют все разнообразие природных штаммов вируса, по-видимому, будет показано при дальнейшем изучении новых штаммов вируса. Изоляты вируса с новых мест и территорий, охватывающих более полно огромный ареал распространения вируса, будут отражать в своем геноме более адекватно все разнообразие условий циркуляции вируса в природе.

Филогенетическое древо, или родословная ВКЭ, построенное авторами работ [43, 46], исходя из последовательности полного гена вирусного белка Е, состоит из трех ветвей, что отражает существование трех репродуктивно изолированных субтипов вируса, первоначально происходящих от одного предшественника. Предполагается, что первичным ареалом становления ВКЭ являлся Дальний Восток России, и отсюда вирус эволюционировал и распространялся в северном полушарии Земли с востока на запад. Это заключение расходится с ранее выдвинутой гипотезой, согласно которой через восточноазиатское и индоазиатские миграционные русла на востоке и восточноевропейские – на западе на территории ареалов I. persulcatus и I. ricinus во время весенней миграции птиц систематически заносились вирусы, некоторые из которых могли адаптироваться к этим видам клещей. В результате дальнейшей эволюции из двух центров и могла сформироваться генетически устойчивая двухвидовая популяция ВКЭ [81].

Эволюция – процесс постепенный, непрерывный и очень длительный. Исходя из средней частоты нуклеотидных замещений в генах изученных штаммов вируса, изолированных в разное время, и зная синономические дистанции филогении нуклеотидных последовательностей вируса, удается оценить общее время станов-

ления флавивирусов из группы антигенного комплекса клещевого энцефалита. По этим данным ВКЭ эволюционирует в течение нескольких тысяч лет и достиг Западной Европы 1–2 тыс. лет назад. Дивергенция дальневосточного и сибирского субтипов вируса произошла 1 700–2 000 лет назад. А отдельный японский клещевой пул вируса на юге острова Хоккайдо со штаммом *Oshima*, по мнению авторов, происходит из Дальнего Востока и образует новый эндемичный район распространения клещевого энцефалита в течение последних 260–430 лет [46].

По данным этих работ средняя частота нуклеотидных замещений в структурных генах ВКЭ достаточно высока и равняется 2,90×10–4 заменам на один сайт в течение года. Однако, она значительно ниже, чем у других распространенных РНК вирусов, например, ВИЧ и ВГС, где частота замещений составляет 1,310×10–2 и 1,308×10–2 замен на один нуклеотидный сайт в год, соответственно. Предполагается, что это как-то связано с двойной природой клеток хозяев-носителей и животных-прокормителей клещей у ВКЭ – членистоногих и позвоночных.

Территориальные антигенные серотипы ВКЭ и их известные, наиболее характерные прототипные штаммы на территории России и в Европе были ранее выявлены серологическими методами в течение длительного времени с учетом существенных антигенных отличий от известных серотипов, широты ареала, их роли в этиологии манифестных форм заболевания (острых, хронических) и влияния штаммов на формирование популяционного иммунитета. Считается, что на территории России к настоящему времени обнаружено пять антигенных вариантов (подтипов) ВКЭ: дальневосточный; западный (центрально-европейский); Вергина; восточносибирский; урало-сибирский. По мнению авторов [52], исходя из результатов разных работ, полученных с помощью различных методов и реагентов, включая моноклональные антитела, позволяющих фиксировать внутривидовые антигенные вариации ВКЭ, можно сделать вывод, что те или иные сероварианты вируса циркулируют на разных, иногда весьма удаленных друг от друга территориях или имеют совместные места обитания. В частности, показано, что штаммы, относящиеся к дальневосточному антигенному варианту, встречаются также в Восточной и Западной Сибири, на Урале и даже на самой западной российской территории – в Калининградской области. В то же время в Восточной и

Западной Сибири обнаружены дальневосточный, восточносибирский и урало-сибирский варианты, на Урале – дальневосточный и урало-сибирский, в Центральном районе европейской России описано выделение штаммов, принадлежащих к вариантам Вергина и западному. Как подчеркивается авторами [52], по-видимому, очень сложно адекватно оценить и свести в единое целое результаты многочисленных работ, посвященных антигенной вариабельности ВКЭ, и тем более попытаться нарисовать картину географического распространения антигенных субтипов (серотипов) в пределах его ареала в силу разнородности методических подходов и оценочных критериев разных исследователей. Как представляется В.И. Злобину и О.З. Горину, для характеристики генетической вариабельности вируса больше подходит сравнение уровней гомологии геномов различных изолятов. Очевидно, это так, однако, как видно из изложенного выше, разночтения вначале были возможны и в установлении генотипов вируса методами секвенирования гена белка Е ВКЭ или молекулярной гибридизации фрагментов кДНК с РНК ВКЭ.

Исторически получилось так, что лабораторная идентификация антигенной неоднородности, и тем самым соответствующей генетической гетерогенности штаммов ВКЭ, проводилась серологическими методами наравне с изучением клинических проявлений клещевого энцефалита в регионах. Например, штамм Айна/1448 (Айна) восточносибирского антигенного подтипа ВКЭ впервые был выделен в 1963 г. из ликвора больной клещевым энцефалитом 11-летней девочки по имени Айна, жительницы лесостепной зоны Иркутской области. Предполагался алиментарный путь заражения через сырое коровье молоко. Заболевание началось внезапно с головной боли с температурой 39°С и с носовым кровотечением. Через 3 недели развился парез правой руки и ноги. Позже в клинике нервных болезней г. Иркутска диагностирована кожевниковская эпилепсия. На 131-й день болезни в крови больной выявлены антитела к аутоштамму при отрицательной реакции с антителами к ВКЭ штамма Софьин. Последующее изучение антигенной структуры штамма Айна с использованием методов РДПА и принципа перекрестной дозированной адсорбции сывороток позволило выявить серологическое отличие этого штамма вируса не только от штамма Софьин дальневосточного, но и от штамма Найдорф западного

серотипа ВКЭ и оценить его как самостоятельный сибирский (восточносибирский) серотип ВКЭ [14].

Установлено, что сибирский серотип ВКЭ с прототипным штаммом Айна включает многочисленные близкородственные штаммы этого вируса, выделенные из различных источников на территории Иркутской, Читинской, Курганской и других областей, Красноярского и Приморского краев, республики Бурятия. Из 47 изученных иркутских штаммов 31 штамм включен в серотип ВКЭ с прототипным штаммом Айна; они составляют однотипную по антигенным свойствам группу с небольшими количественными вариациями. Из них 7 штаммов выделены из мозга грызунов; 15 штаммов – из клещей I. persulcatus, по одному штамму – из клещей D. nuttalli и из мозга утки-широконоски, 5 штаммов – от больных хроническими формами клещевого энцефалита и другими хроническими заболеваниями ЦНС, один штамм – из мозга человека, погибшего при остром клещевом энцефалите.

Связь вируса этого серотипа с этиологией острых и хронических форм клещевого энцефалита подтверждена многими клиническими иммунологическими работами. В группе больных клещевым энцефалитом из Иркутской области сыворотки, избирательно реагирующие только со штаммом Айна, выявляются достоверно чаще (36,8%), чем в целом в популяции (16,6%) [14]. При обследовании больного хроническим клещевым энцефалитом из Красноярского края через 4 и 5 лет от начала заболевания выявлены антигемагглютинины только к штамму Айна в титре 1:20–1:40 при отрицательных результатах реакции с антигенами штаммов 256 (западный штамм, выделенный в Белоруссии) и Софьин (рис. 7). С терапевтическими целями больному была введена инактивированная вакцина клещевого энцефалита из штамма Софьин. Вторичный иммунный ответ характеризовался появлением антигемагглютининов к восточному и к западному серотипам ВКЭ при одновременном резком подъеме титра антител к штамму Айна до 1:320. Данный пример наглядно показывает, что штамм серотипа Айна причастен к этиологии хронического клещевого энцефалита у этого больного, антигены восточного, сибирского и западного серотипов ВКЭ отличаются серологически. Однако, при введении вакцины лицу, имеющему грундиммунитет, индуцированный инфекцией клещевого энцефалита штаммом-возбудителем серотипа Айна, вторичный иммунный ответ имеет более широкий поликлональный, полиштаммовый характер.

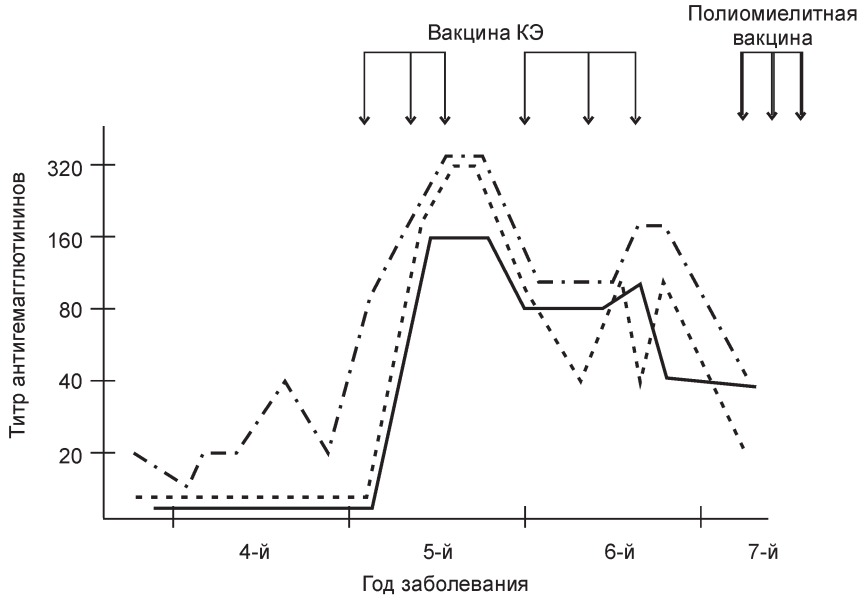

Рис. 7. Динамика антигемагглютининов у больного З-на (прогредиентное течение клещевого энцефалита) до и после вакцинотерапии [14].

В структуре иммунитета к серотипам ВКЭ у здорового серопозитивного населения ряда сибирских регионов вируснейтрализующие антитела к штаммам Айна+Софьин, только к штамму Айна и только к штамму Софьин составляют в %: в Иркутской области 46,8, 34,0 и 19,2; в Читинской области 37,5, 37,5 и 25,0 и в Красноярском крае 63,0, 12,0 и 27,0, соответственно. Таким образом, результаты распределения противовирусных антител у больных клещевым энцефалитом и у здорового населения Сибири выявили участие штамма ВКЭ Айна в формировании гуморального иммунитета у населения целого региона [14]. По результатам молекулярно-генетических исследований штамм Айна отнесен к широко распространенному сибирскому субтипу 3 ВКЭ и признан его прототипным штаммом [43, 77, 78].

Таким образом, генетипические особенности ВКЭ находят отражение в результатах серотипирования возбудителя и сероэпидемиологических исследований ВКЭ-инфекции в эндемичных регио-

нах. При этом следует отметить, что не наблюдается прямой связи между распределением генотипов ВКЭ и распределением видовых различий их носителей – иксодовых клещей по регионам распространения инфекции. Безусловно представляет интерес провести сопоставление особенностей клинической картины клещевого энцефалита по регионам распространения природно-очаговой инфекции с преимущественной циркуляцией отдельных генотипов (серотипов) вируса и видовыми различиями иксодовых клещей.

5.2. Клинические особенности клещевого энцефалита по регионам распространения

В недавней работе [44] авторы изучали особенности клинических проявлений клещевого энцефалита в эндемичных географических регионах с циркуляцией различных генотипов и серотипов возбудителя. Сравнительный анализ заболеваемости, клинической картины, характера течения и исходов клещевого энцефалита проведен на основе статистических данных и данных литературы в Северо-западном регионе (Ленинградская область), в Хабаровском и Приморском краях Дальнего Востока и в Приангарье. По результатам гено- и серотипирования характерным генетическим вариантом ВКЭ в Северо-западном регионе в большей степени является западный генотип с прототипным штаммом Найдорф, на Дальнем Востоке – дальневосточный генотип, штамм Софьин, в Приангарье – сибирский генотип, штамм Айна [24, 43]. Сравнительная характеристика клинико-эпидемиологических показателей клещевого энцефалита в изученных регионах дана в табл. 2.

Прежде всего, различия в клинических показателях инфекции по регионам, если они есть, то носят, так сказать, количественный, а не качественный характер и не выходят за пределы вариантов единой нозологической формы. В продолжительности инкубационного периода в трех исследованных географических регионах существенных различий не установлено. Острое начало заболевания более характерно для дальневосточного региона. Несмотря на более выраженную тяжесть течения, заболевание на Дальнем Востоке характеризуется меньшим по длительности лихорадочным периодом, чем в Приангарье: в среднем, 7,2 дня против 11,7 дня, соответственно.

Основные различия в проявлении клещевого энцефалита в регионах связаны с выраженностью вовлечения в патологический

Таблица 2

Сравнительная характеристика клинико-эпидемиологических показателей клещевого энцефалита в Приангарье, на Дальнем Востоке и в Северо-Западном регионе [44]

Показатель	Приангарье	Дальний Восток	Северо-Западный регион
Основной переносчик	I. persulcatus	I. persulcatus	I. ricinus
Доминирующий генотип ВКЭ и прототипный штамм	Сибирский (Айна/1448) Урало-Сибирский (Лесопарк-11)	Дальневосточный (Софьин)	Центрально-Европейский (Найдорф)
Мужчины, %	65,2 ± 2,4	79,9 ± 0,8*	62,1 ± 2,7**
Женщины, %	34,9 ± 2,4	20,0 ± 0,8*	37,9 ± 2,7**
Трансмиссивноезаражение,%	88,9 ± 1,6	89,9	
Алиментарный путь, %	Нет	2,3 ± 1,2	3,2 ± 1,0
Инкубационный период, дни	10,3 ± 1,4	6 – 15	7 – 14
Острое начало, %	84,3 ± 1,8	91,9 ± 0,9*	89,5 ± 1,7*
Постепенное начало, %	15,7 ± 1,8	8,1 ± 0,9*	10,5 ± 1,7*
Лихорадка, %	99,5 ± 0,3	100**	94,5 ± 1,3*
Головная боль, %	95,8 ± 0,9	94,5 ± 0,8**	87,9 ± 1,8*
Слабость, %	96,6 ± 0,9	100	87,9 ± 1,8*
Формы КЭ, %:			
лихорадочная	39,3 ± 2,4	15,3 ± 0,7*	18,4 ± 1,5*
менингеальная	47,2 ± 2,5	21,1 ± 0,8*	60,0 ± 1,9*
очаговые	13,5 ± 1,23	63,5 ± 0,9*	19,2 ± 0,9*
двухволновая	20,9 ± 2,0	3,3 ± 0,7*	13,7 ± 1,9*
Течение, %:			
легкое	8,1 ± 1,3	—	9,9 ± 1,6**
среднетяжелое	75,2 ± 2,1	31,9 ± 3,6*	66,2 ± 2,6*
тяжелое	16,7 ± 1,8	68,0 ± 3,6*	23,9 ± 2,4*
Менингеальный синдром, %	62,9 ± 2,4	81,3 ± 1,6*	72,6 ± 2,5*
Пребывание на койке, дни	29,9 ± 1,3	44,4 ± 4,7*	40,6*
Летальность, %	2,4 ± 0,3	24,4 ± 0,9*	Нет данных

Примечание: * – различия достоверны, ** – различия не достоверны.

процесс центральной и периферической нервной системы, что отчетливо прослеживается при анализе показателей клинических форм заболевания в регионах. Так, в остром периоде болезни нарушение сознания в виде различной степени оглушенности и комы выявлено в Приморском крае у 62,3 % больных, в Хабаровском – у 43,8% пациентов, а в регионах, характерных по циркуляции сибирского генотипа ВКЭ, значительно реже – всего у 4,7% заболевших.

Заболевание, вызываемое сибирским генотипом вируса, чаще всего проявлялось в виде лихорадочных и менингеальных форм (86,5%). В Приморском крае, где характерно распространение дальневосточного генотипа вируса, чаще других форм регистрировалась менингоэнцефалитическая (35,9–39,3%), реже – менингеальная (26,2%) и лихорадочная (14,0–15,6%).

Основным показателем поражения инфекцией мозга и его структур является частота манифестации очаговых форм заболевания. Очаговые поражения мозга на Дальнем Востоке представляют собой классическую форму клещевого энцефалита, что и является отражением особой тяжести его течения в указанном регионе. Частота проявления очаговых форм в Хабаровском крае составляет 30,9–54,3%, в Приморском крае – 60,1–63,5%, тогда как в Приангарье очаговые формы болезни регистрируются значительно реже – в 13,5% случаев.

У подавляющего большинства больных на Дальнем Востоке наблюдается одноволновое развитие заболевания. Клещевой энцефалит с двухволновой лихорадкой в Приморском крае встречается в 3,4% случаев, в Хабаровском крае – у 6,0% заболевших, а в условиях Приангарья двухволновое течение клещевого энцефалита регистрируется с достоверно более высокой частотой – около 21%.

В Приангарье заболевание в большинстве (75,2%) случаев имеет среднетяжелое течение. Тяжелое течение отмечается у 16,7% больных, тогда как в дальневосточных районах тяжелая клиника наблюдается у 45,5–68,1% заболевших.

В условиях географической зоны с циркуляцией сибирского субтипа ВКЭ остаточные явления отмечены у 16,7% больных. Астеновегетативный синдром наблюдался у 10,8% больных, парез лицевого нерва – у 0,5%, симптом свисающей головы – у 0,5%, слабость мышц шеи и верхних конечностей – у 0,7%, парез одной или двух верхних конечностей – у 1,7%, мышечные атрофии плечевого пояса и верхних конечностей – у 2,9% больных. На Дальнем Восто-

ке с циркуляцией восточного генотипа ВКЭ полное выздоровление наступает лишь у 25,5% пациентов, у 25,3% переболевших выявляется рассеянная симптоматика и у 22,1% – выраженные симптомы поражения головного и спинного мозга.

В Восточно-Сибирском регионе показатели летальности характеризуются более низкими цифрами. Так, за последние 22 года летальность от клещевого энцефалита составила в среднем 2,45%, что достоверно ниже, чем на Дальнем Востоке, где она в отдельные годы колебалась от 8,6 до 44,7% и в среднем составляет свыше 20%.

В Северо-Западном регионе в Ленинградской области среди нейроинфекций клещевой энцефалит занимает одно из первых мест. В 1951–1952 гг. в 78,6% случаев выявлялся алиментарный путь заражения через инфицированное молоко. В настоящее время, как и везде, преобладает трансмиссивный путь заражения при укусе клеща. В Северо-Западном регионе преобладает менингеальная форма заболевания (57–60%) и регистрируется достоверно чаще, чем в Восточно-Сибирском регионе (47,2%). Достоверно реже встречаются лихорадочные формы заболевания (18,4–27,4%) и достоверно чаще – очаговые формы клещевого энцефалита (19,2–29,3%). Частота клинических форм клещевого энцефалита с тяжелым течением в Северо-Западном регионе выше, чем в Восточно-Сибирском регионе. Клещевой энцефалит с двухволновой лихорадкой более характерен для заболевания в Сибирском регионе, чем в Ленинградской области. Здесь следует отметить, что в более ранний период (50–70 гг. прошлого века), как выделено авторами работы [53], «исключительно важным признаком двухволнового менингоэнцефалита оказалась его четко выраженная территориальная локализация, охватывающая в СССР обширные районы Ленинградской области, всю территорию Удмуртской АССР, отдельные районы Белоруссии, а за рубежом – отдельные районы Словакии, Норвегию, Финляндию, Швецию».

Частота двухволновой лихорадки в очагах двухволнового менингоэнцефалита в европейской части СССР в различные годы была равна 65–80% (в среднем 69,4%). Как видно из сопоставления вышеприведенных данных, в последнее время в России наблюдается явное смещение регионов наибольшей распространенности двухволнового клещевого энцефалита с европейской части в Сибирь.

При относительно благополучном развитии острого периода болезни в Иркутской области чаще, чем в других регионах, регистрируются прогредиентное и хроническое течение клещевого энцефалита. В некоторых очагах клещевого энцефалита в районах верхнего течения Ангары и Лены, на севере Иркутской области, частота хронической инфекции доходила до 42–55% [52]. Из более ранних источников известно, что если для патогенеза западного варианта клещевого энцефалита специфично первичное поражение мезенхимальных клеток ЦНС, то для восточного типичны резко выраженные альтеративные изменения с поражением моторных нейронов [53].

За пределами Российской Федерации, например, в северо-восточных лесистых провинциях Китая вспышки клещевого энцефалита протекают тяжело и по общей характеристике близки клещевому энцефалиту на Дальнем Востоке России. В 1952–54 гг. у 83,2% больных развивались параличи, причем у 19,8% больных параличи локализовались в мышцах шеи и плечевого пояса. Летальность составляла 21,7% [1].

В странах Центральной Европы клещевой энцефалит протекает менее остро, примерно как в западных регионах России, и имеет более выраженное двухфазное развитие [40]. Первая фаза инфекции начинается с лихорадки, как при гриппе, с повышением температуры до 38°С. Головная боль, недомогание, боли в мышцах появляются после инкубационного периода от 3 до 7 дней и продолжаются около недели. Затем, после асимптоматического периода продолжительностью до 7 дней, у 20–30% больных проявляются симптомы поражения ЦНС в форме асептических менингитов, менингоэнцефалитов, менингоэнцефаломиелитов или менингоэнцефалорадикулитов. Летальный исход наблюдается в 1–2% случаев, и инфекция у детей протекает легче, чем у взрослых. Менингеальная форма болезни, как правило, завершается выздоровлением. Однако, у 10–20% больных с более тяжелыми клиническими проявлениями длительно сохраняются слабо выраженные нейропсихические расстройства. Нарушения моторики редки.

По мнению авторов анализа клинических данных [44], установленные отличительные особенности проявлений клещевого энцефалита в различных географически удаленных, эндемичных регионах можно связать с циркуляцией генетически различных популяций ВКЭ на этих территориях. Однако, допущение прямой

связи отмеченных клинических особенностей инфекции с определенным генотипом циркулирующего в регионе вируса является упрощенным представлением. Если не вызывает сомнения наличие существенных различий между проявлениями инфекции в дальневосточном и западном или в дальневосточном и сибирском регионах, как это подчеркивается авторами, то трудно видеть разницу в клинической характеристике инфекции в регионах, где превалируют западный или сибирский генотипы вируса, т.е. в европейской части страны и в Сибири. В этой связи А.П. Иерусалимский пишет, что территориально Новосибирская область, расположенная на юге Западной Сибири, ближе находится к очагам заболевания, протекающего по восточному нозогеографическому варианту. Тем не менее, имеется больше оснований считать, что клещевой энцефалит в ней ближе западному варианту. В пользу этого говорят: отчетливое преобладание лихорадочных или менингеальных форм над менингоэнцефалитическими и, особенно, над полиоэнцефалитическими и полиомиелитическими, значительный процент двухволнового течения болезни, хорошие исходы заболевания [1]. С другой стороны, в отдельных эпидочагах инфекции внутри регионов соотношения между различными клиническими формами инфекции (лихорадочная, менингеальная или очаговая) часто варьируют в значительных пределах. О необходимости осторожной интерпретации связи между генотипом возбудителя и проявлениями инфекции, по-видимому, говорит так же и то, что за относительно короткий период времени характерное для определенных территорий двухволновое течение инфекции имеет свойство перемещаться на значительное расстояние между отдаленными регионами. В частности, в недавнем прошлом, всего несколько десятилетий назад, двухволновый энцефалит был широко распространен только в западном и уральском регионах, а теперь – также и в сибирском регионе, где преимущественно распространен соответствующий сибирский генотип ВКЭ. Для более углубленного предметного обсуждения гипотетической связи между генотипом вируса и особенностями вызываемой им инфекции требуется более тщательное рассмотрение имеющихся в литературе сведений о молекулярно-генетической природе вирулентности, нейропатогенности ВКЭ и о наблюдаемых гетерогенных патогенетических свойствах клещевого пула вируса в отдельных эпидочагах эндемичных регионов и динамике клинических показателей природно-очаговой ВКЭ-инфекции во времени.

Из приведенных выше данных также следует, что видовые различия иксодовых клещей–носителей вируса в Сибири (I. persulcatus) и в европейской части России (I. ricinus) не отражаются прямо в клинической картине ВКЭ-инфекции в этих регионах.

5.3. Молекулярные основы нейровирулентности вируса

Сравнительный анализ нейровирулентности в экспериментальной инфекции показывает различную активность штаммов вируса в пределах одного отдельного генотипа. Например, в экспериментальной модели клещевого энцефалита на мышах среди вирусов западного субтипа штамм Hypr более вирулентен, чем прототипный штамм Найдорф [66], а среди вирусов дальневосточного субтипа, кроме высоковирулентного штамма Софьин, показано существование ряда менее вирулентных штаммов, отличающихся также нейровирулентностью между собой. Например, у мышей штаммы Oshima 5-10 и Хабаровск 98-10 более патогенны, чем штаммы Oshima I-1 и Хабаровск 98-5 [46].

Наличие штаммовых различий вируса в развитии манифестной инфекции иногда проявляется не только количественно, как отмечено в приведенных выше примерах, но и качественно. В работе [6] штамм ВКЭ, названный Пищелкин, изолированный из мозга человека, умершего от клещевого энцефалита, и другой, также дальневосточный, штамм ВКЭ 155, изолированный из клещей *I. persulcatus*, высоковирулентные на модели новорожденных белых мышей и вирулентные на экспериментальной модели золотистых хомячков, вызывают на этих двух моделях патологический процесс различного характера. Вирус штамма Пищелкин проявил себя по всем показателям как типичный нейровирулентный штамм, который, репродуцируясь в первую очередь в мозге, затем в крови и селезенке, приводит к нарастающим изменениям в ЦНС – менингоэнцефалиту с выраженными воспалительными явлениями и дегенеративными поражениями нейронов на фоне развивающегося иммунодефицитного состояния. Другой вирулентный штамм 155 вызывал два подъема титра вируса в мозге и в крови животных, что можно трактовать как двухволновое течение инфекции. Несмотря на внутримозговой способ заражения, этот штамм по сравнению с первым приводил к самым значительным изменениям в тимусе и селезенке, свидетельствующим о глубоких поражениях клеток иммунной системы. В то же время, в ЦНС хомячков этот

штамм вируса вызывал также сосудистые нарушения с выраженным отеком мозга при относительной сохранности нейронов. Такое течение инфекции, вызванное штаммом 155 ВКЭ, рассматривается как вирусный нейроиммунопатологический процесс.

Как установлено экспериментально, изменение нейровирулентных свойств ВКЭ происходит в процессе пассирования вируса через мозг восприимчивых животных. В работе [7] на примере штамма 205 ВКЭ, используемого для производства инактивированной вакцины, показано, что в процессе пассирования вируса через мозг высокочувствительных животных не происходит изменений его инфекционной активности на культуре клеток и нейровирулентности при исследовании на мышах. В то же время, установлено повышение нейровирулентности вариантов вируса, прошедших 10 и 20 внутримозговых пассажей на мышах при исследовании вируса на модели низкочувствительных к этому штамму вируса сирийских хомячков. С помощью МКА выявлены антигенные различия в двух эпитопах белка E и в двух эпитопах белка NS3 вариантов вируса 205 до и после 20 пассажей на мышах. Таким образом, изменение нейровирулентных свойств ВКЭ, по-видимому, связано с эволюцией тонкой структуры вирусных антигенов с последующими изменениями их функции и активности. В работе [8] с другим штаммом ВКЭ после проведения 7 пассажей через *I. ricinus* наблюдали персистентную инфекцию у мышей, зараженных таким штаммом, вместо активной репликативной инфекции для исходного штамма вируса до пассирования. Как отмечается авторами, снижение вирулентности ВКЭ в процессе пассирования произошло с изменением всего одного аминокислотного остатка в белке E оболочки вируса. Однако, и дополнительные замещения аминокислотных остатков, кодируемых другими частями вирусного генома, авторами не исключаются.

В обзорной статье McMinn [65] приведены сведения по картированию сайтов геномов флавивирусов, ответственных за нейроинвазивные и нейровирулентные свойства вирусов. При этом нейроинвазивность характеризует свойство вируса реплицироваться в периферических тканях и индуцировать вирусемию в ЦНС путем проникновения через гематоэнцефалический барьер. Нейровирулентность обозначает свойство вируса инициировать цитопатическую инфекцию в ЦНС и вызывать энцефалит. В обзоре приводятся результаты работы Holzmann и др. [67], где аминокислотные заме-

ны в поз. 384 Tyr®His и поз. 368 Gly®Ala на боковой поверхности домена III третичной структуры белка E ВКЭ ассоциируются с потерей нейроинвазивности на мышиной модели инфекции клещевого энцефалита. Мутационная замена в поз. 368, по-видимому, приводит к изменению конформационной подвижности фрагмента полипротеина белковой молекулы при изменении pH.

А.Г. Плетнев и др. на сконструированной ими инфекционной кДНК-химере вируса Денге-4 и ВКЭ с встроенными генами preM и E показали, что, в отличие от низковирулентного векторного вируса Денге-4, кДНК-химерный вирус обладает высоконейровирулентными свойствами, характерными для исходного ВКЭ – донора структурных генов [68]. Однако, химерный вирус не обладал нейроинвазивными свойствами, присущими ВКЭ – донору структурных белков. Изученные авторами мутации в гене белка E, в соответствующем сайте гликозилирования поз. 154 Asp®Leu (домен I на модели димера молекул белка E) и в сайте расщепления preM/M, значительно снижают нейровирулентность химерного вируса ВКЭ/Денге-4 на модели мышей и устраняют его репликацию в культуре клеток. Обе мутации приводят к значительному снижению экспрессии вирусного гликопротеина. Эти результаты показали, что детерминанты нейроинвазивности, нейровирулентности и тем самым нейропатогенноси ВКЭ связаны с точечными мутациями, локализованными внутри генов структурных белков этих вирусов. Эти детерминанты вируса расположены на поверхности димера белка E и так же, как и центры нейтрализации вируса, сгруппированы на доменах I-III поверхностного белка.

Влияние отдельных аминокислотных остатков на поверхности белка E на вирулентные свойства ВКЭ исследовано методом сайт-направленного мутагенеза [22]. Четыре аминокислотных остатка (поз. 308–311), локализованные на боковой поверхности домена III белка E, являются частью предполагаемого центра связывания с клеточными рецепторами для флавивирусов. Были сконструированы мутанты вируса, содержащие одиночные замены а.о., так же, как и комбинации таких мутаций, и проведен анализ вирулентности мутантов на мышах, их вирулентных свойств на культуре клеток и их генетической устойчивости. Наиболее значительная аттенуация вируса достигалась мутацией Thr-310. Комбинация этой мутации с делецией в 3'-нетранслируемом регионе генома вируса дает значительный выход аттенуировнного вирусного штам-

ма. Биологический эффект мутации Thr-310 к Lys, однако, мог быть в значительной мере утерян мутацией в соседнем положении (Lys 311 ® Gly), которая появляется спонтанно при инфицировании мыши мутантным вирусом. Мутации в других позициях а.о. также показывают важность а.о. 308 (Asp) и его взаимодействия с зарядами а.о. 311. В то же время, а.о. 309 мог быть замещен или утерян без заметных биологических последствий. Делеция а.о. 309 сопровождалась спонтанной мутацией в поз. 332 (Phe ® Tyr), которая на трехмерной структурной модели белка Е пространственно соседствует с а.о. 309. По-видимому, процессы аттенуации нейровирулентности ВКЭ, прежде всего, ассоциированы с нарушениями в ранних этапах связывания вируса с нейроном и расплавления клеточной и вирусной мембран.

Как рассматривалось выше, анализ первичной нуклеотидной и аминокислотной последовательностей поверхностного вирусного белка Е выявил наличие как минимум трех генотипов ВКЭ. В пределах отдельного генотипа штаммы вируса отличаются между собой вирулентными, висцерально- и нейропатогенными свойствами. Установленная генотипическая и штаммовая вариабельность ВКЭ, по видимому, связаны с высокой частотой спонтанных нуклеотидных замещений, характерных для РНК-геномных вирусов. Это свойство генома предполагает высокую частоту точечных мутаций замещения нуклеотидов в нем и эволюционную гибкость вируса. У возбудителя природно-очаговой инфекции, в частности, в процессе циркуляции ВКЭ по цепи клещи–животные прокормители–клещи, естественный отбор приводит к постепенному закреплению тех мутаций в геноме, которые лучше соответствуют изменяющимся условиям существования членистоногих носителей вируса и позвоночных прокормителей вирусофорных клещей в природной среде. В результате в наиболее важных, ключевых участках генома ВКЭ, в частности в гене белка Е, в течение длительного периода времени эволюции вируса формируются протяженные устойчивые фрагменты с характерными генотипическими последовательностями нуклеотидов, генетически отражающие соответствующие особенности природных условий длительного существования ВКЭ в пределах региона в целом. В то же время на фоне формирования стабильных генотипических последовательностей нуклеотидов в составе гена имеет место более динамичное закрепление других дополнительных мутаций, ведущих

к формированию многочисленных штаммов вируса, отражающих мозаику местных эпидочаговых особенностей природных условий. Постепенное изменение местных условий существования вируса в изолированном эпидочаге со временем индуцирует закрепление новых мутаций в нуклеотидной последовательности гена и приводит к отбору и накоплению новых штаммов вируса, лучше приспособленных к изменившимся природным условиям. При этом, коль скоро изменение нейроинвазивных, нейровирулентных свойств или нейропатогенности ВКЭ связано со спонтанным появлением единичных или отдельных кластерных нуклеотидных мутаций замещения в гене Е, то следует ожидать, что штаммы вируса одного генотипа между собой будут отличаться гетерогенностью патогенетических свойств.

5.4. Молекулярно-генетическая гетерогенность изолятов вируса и их патогенность

Установление первичной нуклеотидной последовательности полного генома ВКЭ сделало возможным химический синтез олигонуклеотидных ДНК-зондов, комплементарных к любым ранее выбранным фрагментам известной геномной последовательности вирусной РНК. Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот с применением вирусоспецифических ДНК-зондов к наиболее консервативным областям вирусного генома, в первую очередь, использовался в лабораторном анализе для выявления РНК ВКЭ в исследуемых клещах, инфицированной культуре клеток, образцах тканей различных органов и крови от инфицированных вирусом людей и животных. Следующий значительный шаг в применении гибридизационного анализа РНК ВКЭ в исследованиях клещевого энцефалита был сделан синтезом целого набора ДНК-зондов для характерных фрагментов вирусного генома по всей его длине. В первую очередь, были проведены лабораторные и полевые исследования с использованием набора синтетических ДНК-зондов, комплементарных к коротким фрагментам вирусной РНК с определенным положением на генетической карте в концевой 5'-области, С-, preM-, М-, Е- и NS1- генах ВКЭ штамма Софьин [4]. Из опубликованных авторами данных по гибридизации олигонуклеотидных зондов, комплементарных к указанным участкам геномной РНК, следует, что в ходе многократных, до 15 последовательных, пассажей вируса в мозге новорожденных белых мышей происходят

постепенные изменения в нуклеотидной последовательности вирусного генома. Высокая частота изменений, по гибридизационным данным, характерна для участков генома, кодирующих белки preM-, M-, C- и NS1. Наиболее консервативны, как это было ранее известно и из других работ, последовательности нуклеотидов, кодирующие 5'-концевую область генома, белки E и NS3. С другой стороны, как установлено в экспериментах с иксодовыми клещами, иногда достаточно одного пассажа вируса через организм членистоногих, чтобы происходили значительные изменения в режиме гибридизации зондов не только с вариабельными, но и с консервативными областями вирусного генома. Исходя из этих и ряда аналогичных данных, авторами предполагается, что иксодовые клещи как основной резервуар вируса в природе выступают в качестве организма поддержания более широкой штаммовой гетерогенности вируса. Позвоночные прокормители инфицированных вирусом клещей, напротив, служат альтернативным механизмом сужения диапазона гетерогенности вирусного генома. С последующим частым и длительным пассированием вируса через позвоночных происходит постепенная адаптация его к определенному более узкому кругу позвоночных прокормителей в природе, что, по-видимому, постепенно приводит к снижению патогенности ВКЭ для человека.

Из полученных экспериментальных данных следует, что в процессе последовательных репликаций ВКЭ в восприимчивом организме его геном весьма изменчив, и, следовательно, любой природный изолят этого вируса представляет собой один из штаммов гетерогенного по своим молекулярно-генетическим характеристикам клещевого вирусного пула из близкородственных штаммов.

В этой связи возникает вопрос о возможности различной патогенности вирусных изолятов, как в пределах одной территории или природного очага, так и устойчивого природно-очагового пула вируса в целом в отдаленных регионах, в том числе, с генотипическими различиями вируса и видовыми различиями природного резервуара вируса. В частности, на Дальнем Востоке представляло интерес изучить молекулярные основы территориального пула ВКЭ, который, по данным многолетних наблюдений, способен вызывать тяжелые клинические формы клещевого энцефалита на территории Южно-Сихоте-Алиньского очага значительно чаще, чем в других регионах [5]. Образцы местных изолятов ВКЭ по источникам выделения были распределены на 4 группы. Первая группа включала

в себя 8 штаммов ВКЭ, изолированных из основного резервуара и переносчика вируса изучаемого региона – клещей вида *I. persulcatus*. Вторую группу, состоящую из 10 штаммов, выделенных из мозга людей, умерших от клещевого энцефалита, можно рассматривать как искусственно отобранную часть пула высоковирулентных для человека изолятов, обладающих способностью вызывать тяжелую нейроинфекцию с летальным исходом. Третья группа объединяла 7 штаммов, выделенных из крови больных лихорадочной формой клещевого энцефалита, у которых инфекционный процесс ограничился висцеральной фазой. Четвертая группа штаммов, состоящая из 13 непатогенных изолятов, выделенных из крови клинически здоровых людей, представляет группу малоизученных штаммов вируса, так как общепринятыми способами изоляции, они, как правило, не выделяются. Для гибридизации с исследуемыми образцами РНК ВКЭ была использована более представительная, относительно набора зондов предыдущих авторов, коллекция олигонуклеотидных зондов, дополнительно включающая также специфические зонды на NS2 и NS4 гены ВКЭ штамма Софьин.

По результатам анализов абсолютное большинство штаммов 4-й группы (92,3%) реагировало всего с 2–4 зондами, все штаммы вируса 3-й группы (100%) – с 5–7 зондами. «Мозговые» штаммы 2-й группы в 60% случаев реагировали с 5–7 зондами и в 40% случаев с 8–10 зондами, что в большей степени соответствует характеристике штаммов типа Софьин. Первая группа «клещевых» штаммов была самой разнообразной, здесь выявлено более 40% изолятов, подобных штамму Софьин, 14,3% штаммов с генетической характеристикой 2-ой и 3-ей групп и 42,8% штаммов, подобных 4-й группе.

«Клещевые» штаммы с большим разнообразием генофонда можно рассматривать как более гетерогенный матричный пул штаммов ВКЭ, типичный для изучаемого региона. Здесь представлены изоляты с разной патогенетической характеристикой. Среди них, как полагают авторы, около 60% образцов вируса составляют штаммы, способные вызывать у человека заболевание как в легкой лихорадочной форме, так и тяжелую нейроинфекцию с летальным исходом. С другой стороны, около 40% образцов вируса – это штаммы с типичной генетической характеристикой 4-ой группы изолятов, не вызывающие клинических симптомов заболевания. Штаммы ВКЭ, изолированные из мозга умерших и крови больных людей, представляют относительно однородную группу

по сравнению со штаммами, изолированными из клещей. Таким образом показано, что локальный природный пул ВКЭ благодаря молекулярно-генетической неоднородности вирусных РНК способен вызывать как манифестные тяжелые и легкие формы клещевого энцефалита, так и бессимптомные формы ВКЭ-инфекции.

При этом по уровню специфической активности зонды были подразделены на 3 группы, что позволило дать качественную характеристику штаммов ВКЭ в виде гетерогенных молекулярно-генетических вариантов [54]. Группа штаммов, изолированных из клещей, характеризуется более выраженной гетерогенностью, включая все 3 молекулярно-генетических варианта. Выявлена неоднородность распределения молекулярно-генетических вариантов вируса среди штаммов, изолированных из организма человека с различными формами инфекции. У инаппарантных обследуемых доминировали штаммы III генетического варианта (84,6%), а затем II – 15,4%, напротив, при очаговых формах ВКЭ-инфекции доминировали штаммы вируса II генетического варианта до 75% и I-го до 25%. При лихорадочной форме клещевого энцефалита примерно одинаково наблюдались все 3 гетерогенных молекулярно-генетических варианта ВКЭ.

Таким образом, широко вариабельные проявления клещевого энцефалита в эпидочаге ассоциированы с гетерогенными свойствами геномов штаммов вируса – возбудителя инфекции в клещевом пуле. По-видимому, геном дальневосточного клещевого пула ВКЭ обладает наиболее гетерогенными свойствами и в целом представляет сочетание более вирулентных, потенциально очагово-энцефалитогенных штаммов вируса по сравнению с клещевыми пулами вируса в сибирском и западном регионах распространения инфекции.

По результатам молекулярно-биологического изучения ВКЭ, экспериментальных исследований молекулярных основ нейропатогенности в механизме ВКЭ-инфекции и с учетом гетерогенности патогенетических свойств очагового клещевого пула ВКЭ следовало ожидать значительных вариаций в клинических проявлениях клещевого энцефалита не только по регионам распределения отдельных генотипов вируса, но также и по отдельным эпидочагам в пределах территории распространения одного и того-же генотипа вируса. Региональные эпидочаги не представляют собой по ландшафтным, климатическим условиям однообразный массив, а естественную весьма разнообразную по природным условиям со-

вокупность горных, таежно-лесных, озерно-речных, смешанных таежно-луговых, лесостепных и прочих районов. На самом деле, наравне с усредненными клинико-эпидемиологическими данными по регионам, как это представлено в табл. 2 и обсуждалось выше, в отдельных природных очагах клещевого энцефалита наблюдаются существенные различия в клинических проявлениях инфекции. Отмечено [52], что в Читинской области Восточной Сибири установлена высокая частота очаговых форм – до 47,6%, и такая особенность приближает клещевой энцефалит к дальневосточному типу, а отсутствие полирадикулоневротических форм отличает инфекцию от клещевого энцефалита в Западной Сибири, где эта форма наблюдается часто. В Забайкалье отмечается очень редкое (0,8%) осложнение, кожевниковская эпилепсия, по сравнению с данными по соседней Читинской области (5,7%). Хронические формы клещевого энцефалита по отношению ко всем переболевшим в Новосибирской области составляют 0,9%, Томской – 1,0%, а в Иркутской области – 24,7%. Такая мозаичность в характере клинических проявлений клещевого энцефалита по отдельным очагам инфекции общепризнана. При этом выявленные различия в клиническом течении клещевого энцефалита в таежной и лесостепной зонах, в частности, в Тогучинском районе Новосибирской области, как предполагает А.П. Иерусалимский, объясняются различными свойствами таежных и лесостепных штаммов ВКЭ [1].

Эпидочаговые особенности клинических проявлений инфекции, по-видимому, связаны с динамически устанавливающимися соотношениями вирусных штаммов с различными антигенными свойствами и различной степенью патогенности внутри клещевого пула вируса на различных эндемичных по клещевому энцефалиту территориях и районах. А статистически достоверные, интегральные особенности клинических проявлений инфекции в обширных географически удаленных регионах [44] могут представлять собой некоторую постоянную составляющую, связанную с преимущественным распространением отдельных генотипов или субтипов вируса в регионе на повсеместном гетерогенном молекулярно-генетическом фоне вирусов клещевого пула.

Как отмечается автором книги [1], клиника клещевого энцефалита в Прокопьевском районе Кемеровской области прослежена на протяжении 20 лет (1942–61гг.) и трижды описывалась с десятилетними интервалами. Сопоставление клиники и исходов забо-

левания в 1942 г., в 1952 г. и в 1960–61 гг. отчетливо показывает неуклонную эволюцию его с четко выраженной тенденцией ко все более легкому, благоприятному течению. Из очень тяжелого, грозного нейроинфекционного заболевания, нередко приводящего к смерти и часто оставляющего после себя калечащие последствия, клещевой энцефалит в Прокопъевском районе всего за два десятилетия превратился в болезнь, далеко не всегда протекающую по типу нейроинфекции. Из приведенных в книге других источников также известно об изменениях клиники клещевого энцефалита в одном и том же очаге с течением времени в Екатеринбургской, Томской, Новосибирской, Читинской областях, Красноярском, Хабаровском и Приморском краях. Есть аналогичные сообщения из европейской части России и отдельные сведения из восточной и центральной Европы.

При этом направленность эволюции клинической картины ВКЭ-инфекции во времени, за исключением дальневосточных очагов клещевого энцефалита, повсеместно одинакова. Наблюдается все более легкое клиническое течение аналогичных синдромов, перераспределение соотношения клинических синдромов острого периода в пользу преобладания лихорадочных и менингеальных форм со снижением процента клинических форм с поражением спинного мозга и стволового отдела головного мозга. Отмечается учащение двухволнового течения ВКЭ-инфекции, значительное улучшение исходов болезни. По перемещению обширной зоны более высокой распространенности двухволновой формы менингоэнцефалита просматривается также глобальная широтная направленность с запада на восток эволюции инфекции, связанной с особым сочетанием гетерогенных свойств клещевого пула вируса. Установленная повсеместно тенденция смягчения клинической картины болезни в последнее время, по-видимому, связана с возрастанием частоты и длительности пассирования вируса через позвоночных прокормителей клеща по сравнению с частотой и длительностью пассирования вируса через членистоногих носителей вируса. При этом исследователи обращают внимание на повышение роли многочисленных домашних животных в качестве прокормителей вирусофорных клещей в западном и сибирском регионах в последнее время. В этих условиях воспроизводства и поддержания клещевого пула вируса в природе, как это отмечалось выше, может произойти постепенное сужение диапазона гетерогенности

вирусного генома, его антигенной и штаммовой гетерогенности с аттенуацией патогенных свойств ВКЭ.

В заключение А.П. Иерусалимский пишет: «три вида разобранных нами различий клиники клещевого энцефалита: различия клиники в разных географических районах его ареала, различия клиники в близколежащих ландшафтных разностях и изменение клиники заболевания в одном очаге с течением времени отражает собой единый процесс – эволюцию болезни». Как представляется из дополнительного рассмотрения результатов молекулярно-биологических, экспериментально-лабораторных и других работ, приведенных в настоящем обзоре, наблюдаемая эволюция клещевого энцефалита отражает эволюцию ВКЭ, гетерогенных молекулярно-генетических, антигенных, иммуногенных и соответствующих патогенетических свойств очагового клещевого пула возбудителя природно-очаговой инфекции с течением времени. При этом, эволюция ВКЭ, которая отражается в эволюции инфекции, по-видимому, происходит как статистически случайный процесс изменения гетерогенных генетических свойств всех вирионов, составляющих единый клещевой пул вируса, а не как изменение генома отдельно взятого изолята вируса (прототипа).

Основная причина наблюдаемой эволюции клещевого энцефалита, как предполагается рядом исследователей, что справедливо и для эволюции гетерогенных патогенетических свойств клещевого пула ВКЭ, заключается в природопреобразующей деятельности человека в ареале распространения иксодовых клещей – основных носителей вируса. В результате экспансивной жизнедеятельности человека естественные таежные эпидочаги клещевого энцефалита постепенно преобразуются в антропургические очаги с изменением растительного и животного мира в них. Это отражается в эволюции ВКЭ с его растущим приспособлением к домашним позвоночным прокормителям инфицированных вирусом клещей. Частое и длительное пассирование вируса через клетки позвоночных приводит к сужению молекулярно-генетической гетерогенности его генома и аттенуации патогенности вируса. Более заметная эволюция клещевого энцефалита в сибирском регионе в последнее время, по-видимому, связана с ускоренной эволюцией ВКЭ в этом регионе из-за интенсивного освоения южных районов Сибири человеком во второй половине прошлого века. Произошла массовая вырубка леса, распахивание больших площадей земли,

что повсеместно сопровождается вытеснением редких крупных лесных прокормителей клещей многочисленным домашним скотом. Сохранение тяжелой клиники клещевого энцефалита и более высокая смертность пациентов при этой инфекции на Дальнем Востоке, по-видимому, могут быть объяснены более замедленной эволюцией нейропатогенного клещевого пула ВКЭ в эпидочагах инфекции из-за лучшей сохранности таежных природных условий в этом регионе до настоящего времени.

Таким образом, нозогеографические особенности клещевого энцефалита определяются гетерогенными молекулярно-генетическими и соответствующими патогенетическими антигенными свойствами штаммов эпидочагового клещевого пула ВКЭ на определенной территории, а эволюция гетерогенных патогенетических свойств ВКЭ и, соответственно, эволюция природно-очаговой инфекции клещевого энцефалита, по-видимому, отражают изменения природно-антропогенных условий существования вируса в ареале распространения носителей инфекции во времени. По сравнению с относительно быстро меняющимися важными факторами воздействия природных условий на гетерогенный геном эпидочагового клещевого пула вируса генотипические различия вируса или видовые различия его носителей – иксодовых клещей на клинических особенностях клещевого энцефалита отражаются не существенно.

На основании наблюдаемой тенденции в эволюции природно-очаговой инфекции клещевого энцефалита в Евразии можно попытаться прогнозировать дальнейшую эволюцию смягчения клинической картины клещевого энцефалита в Сибири в последующие десятилетия с превращением ее в лихорадочную и менингоэнцефалитическую инфекцию по аналогии с клещевым энцефалитом в Европе. Фактором, замедляющим эту тенденцию, может стать постепенное распространение носителя вируса в Сибири, клеща *I. persulcatus,* в более северные труднодоступные для освоения человеком широты, связанное, например, с глобальным потеплением и смягчением климата. Это может расширить ареал распространения клещевого энцефалита в северном направлении с вовлечением в него мало освоенных таежных районов Сибири и, как следствие, поддержать более высокую молекулярно-генетическую гетерогенность штаммов клещевого пула вируса и способствовать сохранению относительно тяжелых форм клещевого энцефалита в регионе.

6. ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕНЕЗА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

6.1. Репликативная, персистентная и интегративная инфекции

Рассмотренные выше результаты молекулярно-биологических, экспериментальных исследований ВКЭ и изучения клиники клещевого энцефалита дают представления об этиологии, о гетерогенных свойствах клещевого пула вируса и связанных с этим особенностях вирусной природно-очаговой инфекции клещевого энцефалита, ее эволюции. Медицинские аспекты проблемы клещевого энцефалита теснее связаны с патогенезом инфекции у пациента – совокупностью последовательных процессов, определяющих возникновение, развитие и исход нейроинфекции.

ВКЭ проникает в организм человека через кожу при укусе клеща или через пищеварительный и желудочно-кишечный тракты в случае алиментарного заражения при приеме зараженного вирусом молока. Как предполагается, в первом случае местом первичного размножения вируса являются кожа и подкожная клетчатка. При алиментарном заражении происходит быстрая фиксация вируса не только в эпителиальных клетках верхнего отдела пищеварительного тракта, но и в тканях желудочно-кишечного тракта. Затем, как в первом, так и во втором случаях, проникая через капилляры в систему крово- и лимфообращения, вирус начинает размножаться в эпителии кровеносных и лимфатических сосудов, лейкоцитах крови и вместе с ними попадает и размножается в органах иммунной системы, ретикулоэндотелиальной системы, в клетках печени (клетки Купфера), почек и селезенки. Как было показано в лабораторных исследованиях in vitro, заражение ВКЭ лейкоцитной массы человека ведет к активной адсорбции вируса на клетках с последующим латентным периодом инфекции на протяжении первых суток и к интенсивному накоплению вируса как в лейкоцитах, так и в надосадочной жидкости со вторых по пятые сутки. Интенсивно размножаясь во внутренних органах, вирус может постепенно проникать в периферическую невральную и центральную нервную системы. Вопрос о том, преимущественно через гематогенный, лимфогенный или невральный (через

проводящие нервный импульс нейроны периферической нервной системы) пути вирус попадает в мозговые структуры ЦНС, до сих пор остается предметом дискуссии среди исследователей. Не исключено, что в зависимости от гетерогенности антигенных свойств клещевого пула вируса, может реализоваться тот или иной путь проникновения отдельных штаммов вируса в ликвор и определенные отделы ЦНС.

Как висцеральная, так и невральная фазы острого клещевого энцефалита с лихорадочными, менингеальными и очаговыми симптомами, и хронический клещевой энцефалит патогенетически связаны с репликативным, персистентным и, вероятно, еще интегративным механизмами процессов внутриклеточного воспроизводства вируса или сохранения генома ВКЭ в клетках инфицированного макроорганизма. Если в результате активной репликативной инфекции наблюдается интенсивное накопление инфекционного вируса в тканевых клетках и крови, то в процессе персистентной инфекции зрелый, инфекционный вирус в клетках и крови не накапливается, а постепенно на очень низком уровне выделяется из организма в течение продолжительного периода времени. Как выше отмечалось, в процессе репликативной инфекции клещевого энцефалита наряду с инфекционными вирусными частицами из инфицированной вирусом клетки выходят неполноценные интерферирующие вирусные частицы и неполные вирионы, не содержащие нуклеоида, в виде полых цилиндрических частиц вирусной природы, по-видимому, формирующиеся за счет избытка экспрессии белков нуклео- и суперкапсидной оболочки вируса. В экспериментах по инфицированию обезьян ВКЭ штамма Айна или Васильченко в течение длительного времени только в 3-х случаях из тканей был выделен вирулентный или умеренно вирулентный вирус, который вызывал бляшкообразование в культуре куриных эмбрионов и цитопатическое действие в перевиваемой культуре почек эмбриона свиньи (СПЭВ). В 37 случаях в тканях инфицированных обезьян обнаружен только вирусный антиген при отсутствии инфекционного вируса. Флавивирус из антигенного комплекса клещевого энцефалита – низкопатогенный вирус Лангат, штамм ТР-21 – сразу формирует в клетках зараженных животных, в том числе в нейронах, персистентную инфекцию, при которой на фоне активного синтеза вирусного белка резко выражен дефицит продукции инфекционного вируса. Таким образом,

имеющаяся информация по патогенезу клещевого энцефалита допускает обоснованность предположения о том, что в инфицированной клетке параллельно с процессами репликативной инфекции также могут протекать процессы персистентной вирусной инфекции. Если при остром клещевом энцефалите процессы репликативной и персистентной инфекции часто могут быть совмещены, то прогредиентная и, в особенности, хроническая инфекция, по-видимому, поддерживаются преимущественно за счет процессов вирусной персистенции.

Механизм персистентной вирусной инфекции, в отличие от репликативной, не имеет цитопатического действия, персистентная инфекция со временем непременно устанавливает режим длительной сохранности вирусного генома в инфицированной клетке. Длительное персистентное сосуществование вируса и клетки возможно только при устранении элиминирующего вирус из организма действия клеточно-гуморальной иммунной системы макроорганизма [42].

Для выявления причин вирусной персистенции в иммунном организме были проведены эксперименты по инфицированию обезьян макака-резус и сирийских хомячков мутантными штаммами ВКЭ, происходящими от штаммов Айна/1448 и 41/65, выделенных от больных хроническим клещевым энцефалитом, а также от штамма Васильченко, изолированного от больного стертой формой клещевого энцефалита. Широкое распределение персистирующего ВКЭ в организме возможно, если вирус сохраняется в тех же тканях, где был локализован в ранние сроки инфекции и продолжает персистировать в длительно и коротко живущих клетках, преодолевая действие элиминирующих иммунных механизмов. Устойчивое персистирование инфекции также возможно, если вирус повторно распространяется в иммунном организме. Изученные варианты ВКЭ сохраняли способность вызывать вирусемию, т.е. распространяться экстрацеллюлярным путем, который контролируется антителами. Не обнаружены различия в антигенной специфичности родительских и мутантных, персистировавших штаммов вируса. Полагают, что персистенция ВКЭ в иммунном организме не связана с феноменом антигенного дрейфа в такой степени, как, например, персистенция вируса Висна или вируса гриппа. В то же время, персистенция ВКЭ приводит к изменению ряда его характеристик: снижению авидности, повышению способности сенсибилизировать

Т-лимфоциты, более выраженной зависимости репродукции от интерферона. Для поддержания персистентной инфекции ключевыми представляются два момента: сохранение вируса в клетках и особый способ распространения в иммунном организме.

В местах локализации in situ персистирующий ВКЭ более чем в 90% случаев формирует абортивный или латентный тип инфекции без экспрессии антигенов, патогенных и цитодеструктивных свойств. В инфицированных клетках сохраняется вирусная генетическая информация при нарушенном процессе сборки вирионов и репродукции инфекционного потомства. В персистентной инфекции иммунные механизмы, по-видимому, становятся факторами, регулирующими экспрессию вирусного генома. Воздействие иммунодепрессивных и антиинтерферонных факторов (ЦФА, стрептомицин, антиинтерфероновая сыворотка) может приводить к снятию блока репродукции вируса. В том случае, когда персистирующий вирус не имеет существенных дефектов в геноме, по крайней мере, в генах, кодирующих антигенные и патогенные свойства, эти свойства реализуются.

Сохранение и распространение персистирующего ВКЭ также допускается делением зараженных клеток или через межклеточные контакты. Культуру Нер-2/Софьин, хронически инфицированную ВКЭ, в течение одного года пассировали в присутствии специфических противовирусных антител; по результатам лабораторных анализов при отсутствии инфекционного вируса в культуральной среде вирус регулярно выявлялся в дочерних клетках [14].

Возможность реализации другого механизма вирус-клеточного взаимодействия – интегративной инфекции клещевого энцефалита в клетках мозга больных с прогредиентным и хроническим течением инфекции – впервые была показана в работах В.М. Жданова и И.Ф.Баринского с соавторами еще в 70-х годах прошлого столетия [35, 36]. По изложению Погодиной с соавторами основных результатов этих работ [14], инфекционность ядерной ДНК и отсутствие инфекционности цитоплазматической ДНК инфицированной ВКЭ лимфоидной клеточной линии Л-101, свидетельствует в пользу встройки провирусной ДНК в клеточный геном. Полагают, что образование ДНК-провируса в системе хронически инфицированной ВКЭ перевиваемой клеточной линии НЕр-2/Софьин осуществляется посредством обратной транскриптазы ретровируса

или клетки. Косвенным указанием на интегративный механизм взаимодействия служит влияние 5-бром-2-дезоксиуридина (БУДР) на синтез вирусного антигена в культуре клеток HEp-2/Софьин. Анализ кинетики процесса гибридизации нуклеиновых кислот позволил установить, что на гаплоидный набор клетки приходится 5,22–5,64 копии инкорпорированного вирусного генома. Вирус, клонированный из пула ДНК хронически инфицированных клеток, был идентифицирован как дефектный ВКЭ. Он был апатогенным для мышей, слабоиммуногенным, имел дефект в суперкапсидной оболочке.

Следовательно, можно предполагать, что латентно протекающему в течение многих лет хроническому клещевому энцефалиту может соответствовать механизм инфекции с интеграцией вирусного и клеточного геномов. Латентная инфекция – бессимптомная персистенция вируса, при которой не происходит вирусологически доказуемой репродукции возбудителя. Обратная трансформация персистирующей и (или) латентной интегративной инфекции в репликативную ВКЭ-инфекцию с вирусемией и возобновлением клинической манифестации, обострением болезни может быть вызвана воздействием как внешних, так и внутренних факторов активации инфекционного процесса. Внешними активаторами инфекции клещевого энцефалита, как показано в эксперименте, являются некоторые иммунодепрессанты и антибиотики.

Механизмы процессов персистентной, латентной ВКЭ-инфекции пока не изучены.

6.2. Размножение вируса в организме и особенности развития инфекции

В исследованиях вирусемии ВКЭ в периферической крови человека было установлено, что из всего контингента укушенных клещом здоровых и больных клещевым энцефалитом жителей Приморского края инфекционный вирус изолируется преимущественно из лейкоцитов крови здоровых лиц. Из общего числа изолятов ВКЭ 84% штаммов были выделены из крови здоровых людей, укушенных клещами. И антигены ВКЭ определяются иммуноферментным методом значительно чаще в образцах крови от жителей, укушенных клещом, но оставшихся здоровыми, чем в крови от укушенных клещом больных [31, 32]. Таким образом, в этих работах показано, что после укуса клещом инаппарантная и стертые лихорадочные

формы инфицирования ВКЭ распространены намного шире, чем случаи клинически выраженного проявления инфекции в лихорадочной, менингеальной и очаговой формах. Эти работы, как пишут М.П. Исаева с соавт., дают более полное представление о гетерогенности природного вирусного пула, только небольшая часть которой способна вызывать острый клещевой энцефалит с выраженной клинической манифестацией.

При этом специфические антитела к ВКЭ в сыворотке определяются в короткие сроки после укуса клеща у части всех инфицированных, независимо от отсутствия или выраженности симптомов инфекции при последующих наблюдениях. У половины от числа укушенных клещами, инфицированных вирусом людей без симптомов болезни, антигенемия ВКЭ не сопровождается сероконверсией с выявлением противовирусных антител. Со временем титр противовирусных антител в сыворотках от лиц, у кого они выявляются, возрастает, однако, титры антител у инаппарантных инфицированных ниже, чем у больных с менингеальной и очаговой формами инфекции. В конце наблюдений более частая сероконверсия и наиболее высокие титры антител обнаруживаются у тяжелых больных в очаговой форме.

Таким образом, инфекционные, иммуногенные и патогенные свойства штаммов вируса из территориального гетерогенного пула ВКЭ у инфицированных вирусом лиц проявляются вариабельно, и изменения этих свойств у инфицированных коррелируют между собой. Очевидно, значительная часть штаммов клещевого пула вирусной популяции инфекционна для человека. Однако не все, а только часть инфекционных штаммов обладает высокой иммуногенностью в человеческом организме и вызывает быстрое образование вирусоспецифических антител, и, в свою очередь, только незначительная часть высокоиммуногенных по экспрессии специфических антител штаммов вируса также обладают высокой нейропатогенностью. По мнению Г.Н. Леоновой и Г.С. Майстровской с соавт. эти наблюдения согласуются с молекулярно-генетическими гетерогенными и связанными с ними патогенетически вариабельными свойствами вирусных штаммов в территориальном пуле ВКЭ, продемонстрированными этими авторами в рассмотренной выше работе по гибридизации набора синтетических вирусоспецифических полинуклеотидных зондов с нуклеиновыми кислотами из образцов крови жителей Дальнего Востока [5].

При этом, по приведенным результатам наблюдений за 5 лет [31], наиболее часто – в 54,7% случаев – вирусные изоляты из образцов крови исследуемых могли быть выделены в первые 1–4 дня после укуса клещами. На 5–10-й день после укуса вероятность изоляции вируса из крови снижается значительно – до 9,6% случаев, а на 11–20-й день снова возрастает – до 25,0%. По истечении 20 дней и далее вирус выделяется снова с низкой частотой – в 6,3% случаев. Такая особенность изоляции вируса из крови инфицированных лиц во времени, по мнению авторов, отражает волнообразный характер вирусемии у обследованных. Следовательно, наблюдаемые в клинике случаи двухволновой лихорадки острого клещевого энцефалита также могут быть ассоциированы с более выраженной двухволновой вирусемией в периферической крови инфицированных. В острой вирусной инфекции проявление лихорадки – повышение температуры, боли и слабость – это результат процессов аутокринно-паракринной активации иммунокомпетентных клеток – натуральных киллеров, макрофагов, нейтрофилов, Т- и В-лимфоцитов – цитокиновыми медиаторами иммунитета (интерферонами, интерлейкинами) с участием центральной нервной системы и является начальной стадией системной реакции организма на проникновение возбудителя инфекции – чужеродных вирусных антигенов [33, 34]. Очевидно, первая волна лихорадки клещевого энцефалита связана с развитием первой волны висцеральной вирусемии с репликацией ВКЭ в лейкоцитах, подкожных, эпителиальных клетках и, наконец, взаимодействием вируса в крови с иммунной системой макроорганизма. Одновременно, как это следует из появления первых симптомов поражения нервной системы, можно предполагать, что вирус начинает реплицироваться также в клетках периферической нервной системы, распространяясь в организме гематогенным, лимфогенным и/или нейрогенным путем. Проникновение и репликация вируса в спинно-мозговых нервах, клетках спинного мозга и далее в клеточных структурах шейной, затылочной зон головного мозга проявляются в виде развивающихся менингеальных и иногда очаговых симптомов клещевого энцефалита. В том случае, если репликация вируса в нервной системе, в структурах мозга в пределах целостной структуры гематоэнцефалического барьера занимает достаточно длительное время, цитолиз инфицированных клеток и исполнительные механизмы клеточно-гуморального иммунитета инфекции могут в значительной мере

ингибировать висцеральную инфекцию и подавить вирусемию в периферической крови. Новая волна подъема вирусемии в крови и соответствующая повторная лихорадка у пациента тогда могут быть связаны с нарушениями структуры гематоэнцефалического барьера в результате развития вирусной инфекции в тканях мозга. По-видимому, повреждение нативной структуры барьера и рост его проницаемости для вируса ассоциируются с значительными нарушениями тканевых структур мозга в результате интенсивной репликации вируса в них. В этом случае вирус, размножившийся в мозге в значительных концентрациях, по-видимому, снова попадает в кровь, интенсивно реплицируется в интактных клетках крови, вызывает новую волну вирусемии в крови и может снова усилить активацию иммуноцитов, индукцию плейотропных цитокинов и инициировать еще одну волну лихорадки с выраженным менингеальным синдромом.

Такая волнообразная модель вирусемии и лихорадки острого клещевого энцефалита согласуется с неоднородностью и изменчивостью нейропатогенных свойств штаммов ВКЭ из природного клещевого пула. Репликация части штаммов вируса ограничивается только висцеральной инфекцией. Другая часть штаммов вируса также в той или иной мере способна реплицироваться, в основном, в клетках периферийной нервной системы. Только небольшая часть природной популяции вируса способна инфицировать определенные отделы головного мозга. Висцеральная лихорадочная инфекция клещевого энцефалита, ограниченная репликацией вируса вне гематоэнцефалического барьера, протекает с одной лихорадкой. Нейровирулентные высокопатогенные штаммы ВКЭ также вызывают развитие инфекции с одной продолжительной лихорадкой в более тяжелой форме. В этом случае развитие инфекции в мозге и разрушение гематоэнцефалического барьера происходят достаточно быстро. Поэтому ко времени распространения вируса из мозга репликация вируса в лейкоцитах, по-видимому, еще не успевает ингибироваться в значительной мере, и вирусемия во всем организме и в крови поддерживается на более высоком уровне продолжительное время. Лишь в случае легкой и среднетяжелой нейроинфекции, вызванной только слабо нейроинвазивными штаммами ВКЭ, можно ожидать продолжительного проникновения в мозг и медленной репликации вируса в клетках мозга внутри границ гематоэнцефалического барьера.

Можно предполагать, что при затяжном развитии нейроинфекции первоначальная вирусемия в периферической крови успевает подавляться, первая лихорадка спадает и становится возможной новая волна вирусемии в крови за счет репликации вируса в мозге и новая волна лихорадки у больного.

При этом дополнительно к временному фактору, связанному с преодолением гематоэнцефалического барьера вирусом, следует учитывать и фактор изменчивости генома ВКЭ. При репликации вируса в клетках ЦНС, в отличие от клеток висцеральных органов, возможно, с большей вероятностью происходят мутации с образованием новых иммуногенных эпитопов белка Е и других белков у новых нейровирулентных штаммов ВКЭ. Как показано методом иммуноблотта [76], спектры выявляемых антител в ликворе не совпадают со спектром антител в сыворотке крови больных клещевым энцефалитом.

6.3. Иммунитет и цитопатические механизмы инфекции

До сих пор нет специальных публикаций по клиническому изучению вирусемии, кинетики и механизма реакций клеточно-гуморального иммунитета ВКЭ-инфекции с генотипированием иммуноцитов и с анализом индукции цитокиновых медиаторов иммунитета. Результаты более ранних исследований основных аспектов иммунного ответа при клещевом энцефалите были проанализированы в обзоре [14]. Было установлено, что на ранних стадиях инфекции ВКЭ репродуцируется в иммуноцитах и органах системы иммунитета и локализуется в них также в дальнейшем при персистентной инфекции. Выраженный тропизм персистирующего ВКЭ к лимфоидным органам, длительная персистенция в ткани селезенки и лимфатических узлов при бессимптомной инфекции и хроническом энцефалите были показаны в экспериментах на обезьянах и сирийских хомячках.

При остром клещевом энцефалите относительное и абсолютное содержание Т-лимфоцитов в крови снижено. Дефицит Т-клеток выявляется уже в первые дни болезни и постоянно сохраняется в течение первых двух недель. Полная нормализация относительного содержания Т-лимфоцитов происходит позже в период реконвалесценции инфекции через 3 месяца. Функция В-лимфоцитов при острой инфекции не нарушена. Отмечены активная пролиферация В-клеток и 2-кратное повышение их содержания в пери-

ферической крови с нормализацией к концу 3-го месяца. Избирательное поражение Т-системы иммунитета при остром клещевом энцефалите исследователи связывают с размножением вируса в тимусе. Глубина вирусиндуцированной депрессии Т-иммунитета и ее продолжительность прямо коррелируют с тяжестью клинического течения острого клещевого энцефалита.

По сообщению [61], у пациентов с менингеальной формой клещевого энцефалита исследовался иммунный статус, и у большинства выявлен вторичный иммунодефицит с преимущественным снижением количества лимфоцитов фенотипа CD3 и CD4.

Было показано, что цитотоксические Т-лимфоциты – CTL – разрушают зараженные вирусом клетки-мишени in vitro в отсутствие противовирусных антител и комплемента. Также имеются сведения о выявлении активированных цитокинами естественных киллерных клеток – NK, активированных лимфокинами Т-лимфоцитов-киллеров – LAK. Выявлены К-клетки, отвечающие за зависимую от специфических антител цитотоксичность. С помощью активированных макрофагов вирусный антиген предъявляется В- и Т-лимфоцитам в иммуногенной форме. Макрофаги секретируют иммунный интерферон – фактор, стимулирующий дифференцировку В-клеток в присутствии вирусного антигена. Эффекторные функции макрофагов, вирусспецифических антител обеспечивают разрушение вирионов и элиминацию из организма чужеродных антигенов. Однако, в зависимости от чувствительности к действию ферментных систем фагоцитов, штаммы ВКЭ делятся на 2 группы: первая – легко инактивирующиеся макрофагами, вторая – резистентные к действию макрофагов; некоторые вирусы второй группы способны к активной и длительной персистенции в макрофагах. Таким образом, макрофаги, персистентно инфицированные или являющиеся пермиссивной системой для ВКЭ, как предполагается, могут способствовать генерализации и сохранению вирусной инфекции в организме. В этом смысле макрофагальный барьер как защитная система не всегда эффективен. Как видим, и по отношению к макрофагам штаммы ВКЭ биологически неоднородны.

Отражением состояния активного функционирования В-системы иммунитета при острой инфекции служат показатели экспрессии вирусспецифических антител, в основном, против структурного Е антигена. Антитела класса IgM к ВКЭ выявляются с 4-го дня болезни, переключение синтеза ранних антител IgM на

противовирусные антитела класса IgG отмечается примерно на 21-й день с дальнейшим нарастанием титра последних. Уровень антител IgM сохраняется высоким в течение 3-х месяцев, затем снижается, однако эти антитела могут выявляться и спустя 3 года у пациентов с персистентной хронической инфекцией. У пациентов, выздоровевших после острой инфекции, вируснейтрализующие антитела обычно сохраняются в течение десятилетий, антигемагглютинины – 3–4 года, а комплементсвязывающие антитела – 1–6 лет. Титр антител в ликворе больных клещевым энцефалитом ниже, чем в крови, с коэффициентом корреляции, равным около 0,72. Предполагается локальный синтез иммуноглобулинов в мозге и фильтрация белков через поврежденный энцефалический барьер. В работе [76] показано, что ВКЭ-инфекция приводит к индукции гуморального иммунного ответа не только против структурных белков, но также сопоставимой индукции антител против неструктурных белков вируса как в крови, так и в спинномозговой жидкости больных клещевым энцефалитом. Однако, спектры выявляемых антител к вирусным белкам в ликворе не совпадали с таковыми в сыворотке крови. По мнению автора, антитела к неструктурным белкам прежде всего могли индуцироваться в результате разрушения инфицированных клеток в ходе инфекции. Одновременно не исключается и секреция неструктурных белков инфицированными клетами. При этом анализ полученных данных не выявил корреляции между наличием антител, специфичных к индивидуальным вирусным белкам или группе белков ВКЭ, и формой заболевания (лихорадочной, менингеальной или менингоэнцефалитической). В результате делается заключение о том, что специфические антитела не играют существенной роли в защите от инфекции.

Недостаточность гуморального иммунитета для защиты от клещевого энцефалита подтверждается хорошо известными примерами вирусемии при высоких показателях гуморального иммунитета и заболеваемости людей, имеющих вирусспецифические антитела вследствие естественной иммунизации или в результате вакцинации и ревакцинации. Также известны примеры повторного заболевания людей, перенесших клинически выраженные формы клещевого энцефалита с формированием постинфекционного гуморального иммунитета [1]. Развитие хронического клещевого энцефалита, как и острой формы заболевания, происходит на фоне циркулирующих в крови и ликворе вирусспецифических антител.

Из этого следует, что при клещевом энцефалите существуют механизмы, посредством которых ВКЭ избегает элиминирующего действия вируснейтрализующих антител и поддерживает как репликативную, так и, несомненно, персистентную инфекцию.

Ключевое значение в защите организма на ранней стадии инфекции, по-видимому, имеет клеточный иммунитет. Поэтому прогностически значимым для развития инфекции является Т-дефицит и длительная циркуляция антител класса IgM, что может указывать также на нарушение функций эффекторов клеточного иммунитета.

Репликация вируса в чувствительных, пермиссивных клетках в конце концов часто приводит к их гибели в результате цитопатического действия вируса. Предполагается, что эти цитопатические механизмы в инфицированной вирусом клетке лежат в основе цитодеструктивных патологических процессов патогенеза клещевого энцефалита. Выделяют 2 типа гибели инфицированных вирусом клеток – цитолиз и апоптоз. Первый связан с необратимым нарушением целостности клеточных мембран, с воспалительными процессами и разрушением лизосом и аутолизом инфицированной клетки. Инъекция МКА против белков Е и М и антител против неструктурного белка NS1 в эксперименте защищает мышей от флавивирусного энцефалита [40],причем антитела эффективны и на стадии нейроинвазии, тогда как пассивный перенос иммунных клеток на этой стадии инфекции не имеет терапевтического эффекта. В случаях тяжелой или летальной инфекции с активной вирусемией и антигенемией в высоких концентрациях развитие воспалительных реакций в критических органах и тканях осложняет патогенез и убыстряет гибель животных. Показано, что NK и CTL ответственны за лизис инфицированных нейронов и астроцитов. В этих процессах участвует интерферон-индуцированная экспрессия антигенов класса I и II главного комплекса гистосовместимости.

Второй цитоцидный механизм инфицированной вирусом клетки связан с наступлением ее физиологической смерти, вызванной запуском механизма запрограммированной гибели. Апоптозный некроз клетки начинается без нарушения целостности клеточной мембраны [37]. Был изучен индуцированный вирусом апоптоз на моделях инфицированных ВКЭ культур клеток и новорожденных мышей [38]. Опыты проводили с тремя штаммами

ВКЭ: штамм 651, выделенный из крови больного лихорадочной формой клещевого энцефалита; штамм Пищелкин, выделенный из мозга больного, умершего от тяжелого клещевого энцефалита и штамм 155, выделенный из клеща *I. persulcatus*. Все три штамма вируса способны вызывать апоптоз путем олигонуклеосомной фрагментации ДНК клеток головного мозга двухсуточных белых мышей и клеток эмбриональной почки свиньи СПЭВ в результате репликативной вирусной инфекции. Сопоставление показателей титров ВКЭ с динамикой эндонуклеазной фрагментации ДНК клеток СПЭВ указывает на то, что формирование и накопление инфекционного вируса в клетке происходит до наступления гибели клеток. Это дает авторам основание считать, что апоптозный цитопатический эффект ВКЭ, наблюдаемый на клетках СПЭВ, является отражением ответной специфической реакции клетки-хозяина на вирусную инфекцию. В то же время 3 указанных штамма ВКЭ вызывают персистентную инфекцию на клетках Vero-E6 (перевиваемая клеточная линия почки зеленой мартышки), в которых накопление вирусного антигена не сопровождается эндонуклеазной фрагментацией ДНК или какими-либо другими признаками цитопатической деструкции инфицированных клеток. Тот факт, что продуктивная инфекция при заражении разными штаммами ВКЭ клеточной культуры Vero-E6 не сопровождается накоплением инфекционного вируса и деструкцией клеток, может свидетельствовать о том, что персистентный или латентный механизм вирусной инфекции в данном случае определяется генетическими свойствами клеток, в которых ВКЭ не индуцирует апоптоз.

В результате авторы делают вывод о том, что ВКЭ способен вызывать апоптозную, запрограммированную гибель клеток как in vivo, так и in vitro, которая, по-видимому, является одним из механизмов цитопатического действия вируса в некоторых пермиссивных клетках инфицированного ВКЭ организма. В другом сообщении авторы отмечают, что степень выраженности эндонуклеазной фрагментации клеточной ДНК при апоптозе в большей мере соответствовала динамике накопления вирусного антигена, чем вирусной РНК [55].

Еще в 60–70-х годах прошлого века были описаны новые «промежуточные» антигены, появляющиеся в мозге инфицированных ВКЭ животных и в сыворотке крови больных, отличные от антигенов вируса и нервной ткани. Антитела к неоантигенам выявля-

лись с наибольшей частотой в стадии неуклонного прогрессирования инфекции, предшествующей развитию прогредиентного течения заболевания. Считается, что новые антигенные субстанции, обладающие выраженными аллергическими свойствами, играют роль при трансформации острого клещевого энцефалита в хроническую инфекцию.

Очевидно, патогенетическими факторами ВКЭ-инфекции, кроме прямого цитопатического действия репликативной вирусной инфекции, служат также цитопатические механизмы клеточного иммунитета с участием CTL и вирусиндуцированного апоптоза. В то же время, эти факторы наравне с вирусспецифическими антителами, несомненно, ускоряют элиминацию возбудителя инфекции, и без сочетанного действия клеточно-гуморального иммунитета едва ли возможно выздоровление. Не исключено, что индукция антител гуморального иммунитета не всегда эффективно сочетается с развитием клеточного иммунитета. По-видимому, в пользу такого предположения говорит выше отмеченное клиническое наблюдение: наиболее высокие титры гуморальных антител выявляются только у больных клещевым энцефалитом в тяжелой очаговой форме [31, 32].

6.4. Патоморфология нейроинфекции острого и хронического клещевого энцефалита

Патологический процесс в нервной системе при остром клещевом энцефалите носит чрезвычайно диффузный характер [14]. Поражаются оболочки головного и спинного мозга, буквально все отделы ЦНС, включая серое и белое вещество, корешки и периферические нервы. Процесс можно определить как менинго-энцефало-миело-радикуло-неврит или панэнцефалит по Кролю. Однако, характер, частота и интенсивность поражений различных отделов ЦНС неодинаковы. В первую очередь, постоянно и более тяжело поражается шейный отдел спинного мозга, особенно передние рога. Менее тяжелым считается воспалительный процесс в области варолиева моста, продолговатого и среднего мозга. Постоянны, хотя и не всегда одинаковы по силе и распространению изменения в двигательных ядрах продолговатого мозга и варолиева моста, черного вещества Зоммеринга, в красных ядрах, центрального серого вещества в области сильвиева водопровода. Из всех образований стволовой части мозга особо выделяется постоянство и сила

поражений нижней оливы. Воспаление распространяется также на дорсальные и вентральные отделы ствола. Далее по выраженности воспалительных изменений следуют промежуточный мозг и подкорковые узлы, а также кора мозжечка. Наконец, наименее выражен и наименее постоянен патологический процесс в коре головного мозга. Снижение интенсивности поражений происходит и в сторону поясничного отдела спинного мозга.

Локализация патологического процесса при хроническом клещевом энцефалите характеризуется еще большей диффузностью, чем при острой инфекции. Причем процесс может распространяться как в оральном направлении в сторону коры головного мозга и в самой коре, так и в сторону поясничного отдела спинного мозга, а также на образования ЦНС, которые не были поражены в период острой инфекции. Из той или иной комбинации поражений в выше отмеченных структурных образованиях мозга и складывается топография патологии в нервной системе больных хронической ВКЭ-инфекцией.

В случае хронического клещевого энцефалита у Чумакова посмертное исследование его мозга было проведено спустя 56 лет после первоначального инфицирования вирусом [49]. Изучены 18 участков головного и спинного мозга, селезенка, печень. В ЦНС выявлен вялотекущий, хронический прогрессирующий полиморфный процесс. Он представлял комбинацию последствий острой стадии клещевого энцефалита, хронического клещевого энцефалита, вторичных неспецифических и возрастных изменений. Особенно тяжелые изменения были в передних рогах шейного отдела спинного мозга, где наблюдалось почти полное отсутствие мотонейронов, выраженный глиосклероз. Тяжелые изменения обнаружены в среднем мозге, варолиевом мосту, подкорковых узлах, мозжечке, продолговатом мозге. Кора головного мозга хорошо сохранена. В правой двигательной коре методом ПЦР выявлена РНК ВКЭ. Инфекционный вирус не был выделен методами эксплантации ткани и пассажей на сосунках белых мышей и клетках СПЭВ, HeLa, RH. И вирусный антиген не определен методами ИФА и МФА. В 1985 и 1993 гг. методом ИФА в сыворотке крови выявлены антитела класса IgG к ВКЭ в титре 1:1280. Специфические IgM не найдены.

Характер альтерации в нервной системе при остром клещевом энцефалите описывается как массовое выпадение нервных

клеток в первые дни заболевания. Оставшиеся нейроны в зоне поражений находятся в различных состояниях набухания, расплавления, распада, кариоцитоза, пикноза и гиперхроматоза. В условиях хронической инфекции наблюдаются все те поражения, что и при острой инфекции. Можно говорить лишь о том, какой вид поражений в клетках превалирует. При хронической инфекции наиболее распространенные и типичные изменения в нервных клетках – это их сморщивание и хроматолиз – дезинтеграция микроскопических белковых образований в нервных клетках. Уже в острый период воспалительные изменения в мозговой ткани не всегда тождественны. В большинстве случаев они характеризуются экссудативно-пролиферативными явлениями. Однако, иногда воспалительная реакция в ткани мозга протекает атипично, при полном отсутствии продуктивных и экссудативных компонентов воспаления, когда периваскулярная инфильтрация ничтожна. Нигде в мозговой ткани не наблюдается распространения воспалительного инфильтрата. Воспалительный процесс выражен в виде узелков микроглиальной пролиферации. В отношении этих случаев особенно подчеркивается несоответствие между тяжестью клинического течения и слабой выраженностью воспалительных реактивных явлений при наличии резких дегенеративных изменений мозговой ткани. Именно эти случаи отличаются наибольшей тяжестью течения клещевого энцефалита.

Однако, в большинстве случаев острой инфекции наблюдаются выраженные экссудативные изменения, прежде всего тяжелые расстройства кровообращения в виде резкой гиперемии и стазов в мелких сосудах и капиллярах, а также кровоизлияний путем миграции клеток через стенки кровеносных сосудов в ткани. Стенки сосудов отечные, набухшие. Эндотелий сосудов с признаками набухания и пикноза – конденсации ядра клетки, сопровождающейся его сморщиванием в гиперхромную плотную массу. Местами сосудистая стенка некротизирована, что повышает ее проницаемость. Расстройство кровообращения сопровождается интенсивным серозным отеком мозговой ткани вокруг вен разных калибров. Клетки микроглии, олигодендроглии и полиморфно-ядерные лейкоциты на ранних сроках образуют также очаги нейронофагии. Нередки явления выраженного разрушения клетками микроглии дендритов, образующих синапсы нейронов. Эти некробиотические изменения экто- и микроглии являются показателем токсичности

процесса. В острой инфекции в стенках и по ходу сосудов периваскулярно, а также вне сосудов в ткани мозга наблюдаются значительные клеточные инфильтраты из лимфоидных клеток, полибластов, полиморфно-ядерных лейкоцитов и немногочисленных плазматических клеток.

В дальнейшем, в период еще острого заболевания, воспалительные явления вокруг сосудов постепенно угасают. Изменяется также клеточный состав инфильтрата. Происходит распад и исчезновение полиморфно-ядерных лейкоцитов. Количество плазматических клеток заметно нарастает при преобладании в инфильтрате лимфоидных клеток. Наряду с клеточной инфильтрацией гематогенного происхождения в ЦНС больных уже в ранние сроки инфекции наблюдается пролиферация клеток внешней стенки сосудов и глии. Разрастание клеток микроглии и олигодендроглии носит очаговый и диффузный характер.

Как показывают результаты электронно-микроскопических исследований ЦНС у больных, для острого периода инфекции характерны локализация и репродукция вируса, в основном, в нервных клетках. Процесс репликации вируса сопровождается распадом и редукцией органелл клеток с выраженной гиперплазией гладких мембран, вакуолизацией и везикулизацией цитоплазмы. По мере завершения сборки вирусов в органеллах нервных клеток происходят тяжелые деструктивные изменения с распадом ядерной и плазматической мембраны, выходом остатков органелл и вируса в межклеточное пространство.

Тяжелые изменения с отеком, распадом и расплавлением ультраструктур наблюдаются также в клетках глии, безмякотных и миелинизированных волокнах, в клетках воспалительного инфильтрата, макрофагах, лимфоцитах, стенках сосудов, что в итоге приводит к полной дискомплексации ткани в очаге поражения. Патологические изменения в нейронах и окружающих их тканевых элементах (глия, клетки воспалительного инфильтрата, отростки, стенки сосудов) возникают одновременно в ранние сроки инфекции и развиваются параллельно.

Морфогенез вируса происходит следующим образом: нуклеотиды вируса локализуются на мембранах эндоплазматической сети и частично в цитоплазматическом матриксе нервных клеток. Морфологически зрелые вирионы отпочковываются с мембран в резервуары эндоплазматической сети, пластинчатого комплек-

са, в вакуоли и везикулы. Вокруг электронно-плотного нуклеоида зрелого вириона хорошо выражена белковая суперкапсидная оболочка.

В экспериментальных исследованиях у обезьян с хронической формой клещевого энцефалита, как и у людей, наблюдается персистенция вируса. Находки вирулентного инфекционного вируса редки. При этом хронический клещевой энцефалит в поздние сроки имеет существенные патоморфологические и патогенетические особенности по сравнению с острой инфекцией. Различия заключаются, прежде всего, в отсутствии воспаления, клеточных инфильтратов и пролифератов клеток, гиперемии при наличии распространенных альтеративных изменений в клеточных и межклеточных элементах нервной системы, резком отеке ткани мозга. При этом отсутствует активная репродукция вируса и выявляются немногочисленные вирионы с измененной суперкапсидной оболочкой в цитоплазме нейронов и межклеточных пространствах. Патогистологический процесс носит дегенеративный, а не воспалительный характер, как при острой инфекции.

По результатам изучения 37 летальных случаев клещевого энцефалита у людей авторы работы [60] отмечают, что выраженность альтеративной компоненты воспаления и связанной с ней тяжести повреждения нейронов, наиболее часто вовлекаемых при клещевом энцефалите структурах ЦНС, а также инфильтративно-пролиферативная компонента патологического процесса имеют относительную зависимость от клинических проявлений заболевания. Среди особенностей реакции мозговой ткани при воздействии вируса отмечается ранняя пролиферация микроглии, которая является разновидностью макрофагов. Выраженность ее зависит от степени повреждения нейронов. При бурно протекающей инфекции (3–10 суток) в мозге преобладают сосудистые расстройства при почти полном отсутствии околососудистых инфильтратов. В более поздние сроки (до 30 суток) нередко инфильтративная реакция слабо выражена, и лишь в 1/3 случаев имеются приваскулярные муфты из мононуклеарных клеток. Это указывает на то, что заболевание часто развивается при вирусиндуцированном подавлении воспалительных реакций клеточного иммунитета в ткани мозга, что непосредственно отражается на клинико-морфологических особенностях дальневосточного варианта клещевого энцефалита.

6.5. Экспрессия антигенов HLA-комплекса и гуморальный иммунитет ВКЭ-инфекции

Праймированные вирусным антигеном цитотоксические Т-лимфоциты – CTL – и хелперные Т-лимфоциты – Th – свои эффекторные функции могут выполнить только в том случае, если соответствующий антигенный вирусный эпитоп для связывания с Т-клеточным рецептором презентируется на поверхности инфицированных клеток или лизогенных макрофагов в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости HLA. Такая рестрикция клеточных взаимодействий осуществляется посредством антигенов HLA, гены которого расположены в 6-ой хромосоме человека. Три локуса антигенов класса I в геноме человека обозначены как HLA-A, HLA-B и HLA-C, а три локуса антигенов класса II – HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR. Локусы представляют собой комплекс многих тесно сцепленных между собой генов, каждый из которых имеет множество аллельных вариантов. Аллельные вариации генов молекул HLA и их характерные сочетания у каждого индивидуума определяются наследственностью и уникальны. В настоящее время нет возможностей определить, почему из неограниченного числа аллелей молекул HLA те или иные молекулы преимущественно участвуют в механизме антигенной рестрикции межклеточных взаимодействий клеточно-гуморального иммунитета инфекции. Поэтому на данном этапе исследований влияние наследственного фона на развитие иммунитета ограничивается выявлением ассоциативной связи между экспрессией тех или иных молекул HLA на лимфоцитах индивидуумов с характерными особенностями развития иммунитета и инфекции в целом у обследуемых.

Ранее была обнаружена иммуногенетическая ассоциированность HLA-антигенов с предрасположенностью или резистентностью к заболеванию клещевым энцефалитом после укуса вирусофорным клещом, с благоприятным или неблагоприятным исходом клещевого энцефалита. Далее ассоциированность HLA-антигенов класса I с уровнем противовирусных антител и сывороточных иммуноглобулинов основных классов (IgM и IgG) была изучена у 97 больных клещевым энцефалитом в лихорадочной и других формах с поражением оболочек и/или вещества головного и/или спинного мозга при иммунологическом и иммуногенетическом обследовании [39].

Сравнительный анализ динамики и уровня синтеза специфических и общих антител класса IgM и IgG в группах больных

выявил различную ассоциированность HLA-антигенов с этими процессами. Во-первых, одни из этих антигенов или их сочетания друг с другом ассоциировались с высокой положительной динамикой гуморального иммунного ответа на ВКЭ: антигены HLA-A10, -7, B12, межлокусные сочетания HLA-антигенов A2/B7, A2/B12, A3/B7, A3/B12, A10/B7 для специфических IgM; антигены HLA-A2, -B12, -B16, -B18, -B35, внутри- и межлокусные сочетания антигенов A2/B12, A3/B12, A2, 9 для специфических IgG. Другие антигены и их комбинации: A1, B5, B18, B/40, B2/B18, A2, 28 для антител класса IgM и HLA-A11, A-15, B40, Cw3, -A11/B7 для специфических IgG-антител – ассоциировались с более низкими уровнями иммуноглобулинов при специфическом иммунном ответе на ВКЭ.

Во-вторых, антигены, ассоциированные с высокими уровнями иммуноглобулинов, «предопределяли» и более быстрое достижение их максимальных значений в крови. Так, средние титры специфических антител класса IgM в группах больных, позитивных по данным антигенам, достигали максимальных значений 9,3–9,8 log в основном до 21-го дня болезни. В противоположной группе максимальные титры IgM были в пределах 8,7–8,8 log и достигались после 21-го дня. Та же тенденция сохранялась и при накоплении специфических антител класса IgG; максимальные значения антител IgG, равные 8,5–9,0 log и 8,0–8,2 log, достигались в оппозитных группах к 28–35-му и 35–42-му дню болезни, соответственно.

В-третьих, определенные антигены, например, HLA-B12, и особенно его сочетания с HLA-A3 (A3/B12), ассоциировались не только с интенсивной продукцией антител IgM, но и с задержкой ее переключения на синтез антител IgG (такое переключение происходило лишь к 35–42-му дню болезни). В течение болезни в крови больных увеличивалось содержание не только специфических антител, но и сывороточных иммуноглобулинов основных классов. Анализ уровня сывороточных иммуноглобулинов у больных клещевым энцефалитом в процессе заболевания также выявил их ассоциированность с определенными HLA-маркерами. Например, молекула HLA-B7 ассоциирована с высоким уровнем IgM и IgG. Межлокусное сочетание HLA-антигенов A10/B7 ассоциировано с высоким уровнем сывороточных IgM, а антигены HLA-A2 и HLA-B16 – с сывороточными IgG. Антиген HLA-Cw3 ассоциировался с низким уровнем сывороточных иммуноглобулинов основных классов, комбинация антигенов A2/B18 – с низким уровнем IgM, а антиген

HLA-A3 – с низким уровнем сывороточных IgG. Различия между оппозитными по HLA-фенотипу группами были наиболее выражены в острой фазе инфекции (на 7–14 день болезни).

Л.О. Черницына с соавторами также показали, что клинический полиморфизм клещевого энцефалита в значительной мере определяется индивидуальными особенностями иммунной системы организма, что проявлялось в тесной ассоциированности с аллельными вариантами генов главного комплекса гистосовместимости: у больных с одинаковыми клиническими проявлениями клещевого энцефалита достоверно чаще встречались определенные аллельные варианты генов HLA-комплекса. Достоверно позитивные ассоциативные связи у больных клещевым энцефалитом выявлены для следующих HLA-фенотипов: A2/B18, A9/B16, A9/B21, A28/B12, A2, 2, B5, 16. Антиген A10, а также фенотип A3/B5 определяют высокий риск развития клещевого энцефалита с поражением оболочек и вещества головного мозга, а антиген B40 и такие фенотипы, как A1/B5, A1/B18, A3/B40 ассоциированы с лихорадочной формой заболевания. Антигены A10, A11, а также фенотипы A10/B7, A10/B16, A11/B7, A11/B35, A2, 10, A3, 11 определяют предрасположенность к развитию двухволнового течения заболевания клещевым энцефалитом. Выявлена группа фенотипов, играющих защитную роль: A1/B35, A9/B27, A2, 19, B35/40. Также были установлены достоверные различия напряженности гуморального иммунного ответа у больных с разными клиническими формами и вариантами течения клещевого энцефалита: тяжесть клинического течения болезни коррелирует с характером и динамикой синтеза специфических иммуноглобулинов основных классов. На основании выявленных закономерностей авторами предлагаются новые подходы к прогнозированию эффективности лечения и профилактики клещевого энцефалита на популяционном уровне [50, 51].

По существу, к аналогичным заключениям об ассоциированности молекулярно-генетических маркеров пациентов с особенностями персистентной инфекции приходят авторы работы по клиническому изучению гепатита С, вызываемого также одним из флавивирусов семейства Flaviviridae. Высокие показатели диагностического коэффициента в ряде случаев на основании изолированных иммуногенетических критериев позволяют с известной степенью достоверности прогнозировать наиболее вероятный вариант клинического течения инфекции [75].

Следует подчеркнуть, что ассоциативную связь наследственного фактора пациентов с проявлением различных клинических форм клещевого энцефалита удается установить несмотря на очевидную гетерогенность патогенгетических свойств клещевого пула ВКЭ. Из этого следует, что та или иная клиническая форма клещевого энцефалита реализуется в результате хорошо сбалансированного взаимодействия организма с патогеном. В инфекционном процессе наиболее полно используются полипотентные защитные возможности иммунной системы пациента при инфицировании организма штаммами вируса различной патогенности. По-видимому, механизм рестрикции межклеточных взаимодействий оптимального гуморально-клеточного иммунитета при образовании презентируемого инфицированными клетками или активированными макрофагами комплекса гистосовместимости включает конкурентный отбор необходимых антигенов HLA из множества их вариантов с учетом степени токсической, висцерально- или нейропатогенной активности антигена ВКЭ, экспонируемого в комплексе для связывания рецепторов эффекторных Т- или В-лимфоцитов. Гетерогенными свойствами возбудителя инфекции и адекватно вариабельным алгоритмом развития иммунного ответа, возможно, объясняется чрезвычайное разнообразие течения нейровисцеральной инфекции в инаппарантной, стертой субклинической, лихорадочной, менингеальной, очаговой формах. Более того, благодаря вариабельности иммунного ответа организма на особенные биологические свойства возбудителя клещевой энцефалит может развиваться также в режиме одно- и двухволновой острой инфекции или в форме прогредиентного и хронического энцефалита.

6.6. Развитие общей концепции патогенеза клещевого энцефалита и прогноз исхода инфекции

Особенность патогенеза клещевого энцефалита, в общем случае, связана с наличием висцеральной и невральной фаз инфекции. Тем не менее, часто ВКЭ-инфекция ограничивается только экстраневральной фазой. Сюда относятся частые случаи инаппарантной и субклинической, стертой лихорадочной форм инфекции с естественным формированием иммунного статуса у подавляющего большинства населения, постоянно проживающего на территориях природных очагов клещевого энцефалита. Как подчеркивается при этом, у людей с установившимся иммунным статусом к ВКЭ-инфекции, не остается никаких признаков вовлечения в инфекцию

ЦНС. Развитие иммунных процессов только в экстраневральной стадии составляет также основу активной вакцинопрофилактики этой инфекции. Однако, выраженность менингеальной, очаговой симптоматики у больных и последствия инфекции с поражением определенных отделов ЦНС не оставляют сомнения в том, что манифестная инфекция клещевого энцефалита во многих случаях не ограничивается висцеральной фазой.

Очевидно, развитие более сложной висцерально-невральной инфекции в каждом отдельном случае может быть связано как с присутствием особо нейровирулентных штаммов в клещевом пуле вируса, так и с дефицитом системы клеточно-гуморального иммунитета пациента. Гетерогенность генома и патогенных свойств ВКЭ широко обсуждались в настоящем обзоре. С другой стороны, неадекватный иммунный ответ организма с развитием вторичного иммунодефицита на висцеральном этапе инфекции, по-видимому, может способствовать развитию инфекции также в ЦНС. В процессе инфекции иммунопатогенный штамм вируса как бы помогает обходить иммунный барьер нейроинвазивным, нейровирулентным штаммам из клещевого пула вируса. Как бы то ни было, особенности иммуно- и нейропатогенеза клещевого энцефалита, в первую очередь, связаны с характером взаимодействия гетерогенного молекулярно-генетического клещевого пула ВКЭ на территории с иммунной системой пациента с ее индивидуальными иммуногенетическими особенностями. О том, что течение острой и, возможно, хронической инфекции тоже в значительной мере детерминировано со стороны макроорганизма, подтверждают приведенные выше результаты изучения ассоциированности проявления серологических показателей, различных клинических проявлений инфекции у больных с экспрессией определенных антигенов HLA комплекса гистосовместимости.

Наличие двух патогенных фаз развития инфекции характерно и для других флавивирусных инфекций. Например, в инфекции, вызываемой вирусом желтой лихорадки, быстрое развитие висцеральной фазы приводит к гепатиту, а невральной – к энцефалиту. При этом в значительном большинстве случаев сложная висцерально-невральная инфекция желтой лихорадки или клещевого энцефалита заканчиваются выздоровлением. Таким образом, наиболее частый исход сложной нейровирусной инфекции, как и в случае только висцеральной – выздоровление больного и

достижение иммунного статуса. Из этого следует, что развитие, купирование инфекции, стадия реконвалесценции и становление иммунного статуса сложной сочетанной висцерально-невральной инфекции клещевого энцефалита также предусматриваются естественным алгоритмом развития острой циклической нейровирусной инфекции.

В общем вирусоиммуногенетическом представлении патогенеза клещевого энцефалита пока еще не определены место и роль тяжелой вторичной иммунопатологии, персистенции и интеграции вируса в острой и хронической инфекции. То, что с нетипичным (неоптимальным) развитием острой инфекции связаны необратимое осложнение острой ВКЭ-инфекции или ее трансформация в хронический клещевой энцефалит, пока можно только предполагать. Также можно предполагать, что реакция иммунной системы индивидуумов с клещевым пулом вируса с особыми неоднородными свойствами приводит к необычному алгоритму острой циклической инфекции – двухволновому клещевому энцефалиту.

Клинически манифестная острая циклическая инфекция клещевого энцефалита, как и другие острые вирусные инфекции, начинается с инкубационного периода, развивается в стадии острой висцеральной или сочетанной висцерально-невральной инфекции разной продолжительности и, как правило, завершается элиминацией вируса, выздоровлением больного и установлением иммунного статуса. Весь этот наиболее часто наблюдающийся процесс протекает по определенному естественному алгоритму острой инфекции взаимодействия иммунной системы человека с вирусом, выработанному организмом эволюционно при регулярных внедрениях чужеродных антигенов вирусной природы в течение всего времени становления вирусных инфекций. Предполагаемый алгоритм острой инфекции состоит из определенных этапов или стадий инфекции, развития иммунитета, последовательности основных процессов патогенеза в целом. Основные стадии инфекции в виде инкубационного периода, клинически манифестной стадии острой инфекции с развитием клеточно-гуморального иммунитета и стадии реконвалесценции с полной элиминацией вируса из организма характерны для острых циклических инфекций. Однако, алгоритм конкретной вирусной инфекции содержит частные особенности, связанные с молекулярно-генетическими, функциональными различиями, клеточным и тканевым тропизмом

возбудителя инфекции. С учетом этих особенностей необратимые осложнения острой инфекции, трансформация в хроническую инфекцию у пациента и, тем самым, выпадение стадии реконвалесценции возникают как результат определенного отклонения от установившегося алгоритма развития защитного иммунитета острой циклической инфекции.

В настоящее время развитие клинических лабораторных методов анализа позволяет проследить за изменением концентрации вирусологических маркеров, антигенных и геномных; за экспрессией HLA-антигенов в комплексе с вирусными антигенами; за индукцией иммунологических маркеров и факторов клеточно-гуморального иммунитета – вирусспецифических иммуноглобулинов класса IgM и IgG; хорошо известных иммунорегулирующих, иммуномодулирующих и провоспалительных, апоптозных цитокинов (интерферонов, интерлейкинов, ФНО и других сывороточных факторов); проследить за активацией, пролиферацией и динамикой численности эффекторов клеточного иммунитета: клонов цитотоксических и хелперных Т-лимфоцитов, антителосинтезирующих В-лимфоцитов и плазматических клеток, макрофагов, NK- и К-клеток. Сюда следует присоединить также результаты часто проводимых биохимических анализов и других современных инструментальных клинических исследований пациента. Последовательным сопоставлением динамики объективных данных лабораторного анализа с результатами других клинических исследований и наблюдений за состоянием пациента можно установить стадии развития острой циклической инфекции с учетом смены ее клинических фаз: продромы, острой фазы инфекции с развитием клеточно-гуморального иммунитета, ранней и поздней реконвалесценции. Природный алгоритм выздоровления может быть описан установлением уровня индукции основных генетических и антигенных вирусологических, иммунологических, иммунометрических, цитокиновых, биохимических и др. маркеров острой инфекции на определенных стадиях развития репликативной и персистентной инфекции клещевого энцефалита. Динамика основных маркеров инфекции может быть описана с учетом клинических особенностей лихорадочной, менингеальной или менингоэнцефалитической очаговой форм острого клещевого энцефалита. Сформулированный таким образом алгоритм острой инфекции позволит проследить за размножением возбудителя, установить параметры оптимального

развития клеточно-гуморального защитного иммунитета с дифференциацией антительного, воспалительного и апоптозного компонентов эффекторных реакций, проследить за нейтрализацией и последующей элиминацией возбудителя из организма, проследить за становлением иммунного статуса по результатам динамического лабораторного обследования пациентов.

В результате лечащий врач еще в ходе инфекции может своевременно сформулировать благоприятный прогноз исхода инфекции на основании характера реализации обобщенного алгоритма острой циклической инфекции. Примерно такой аналитический подход был использован при обзоре литературы по гепатиту В [71]. С учетом опубликованных результатов клинических и экспериментальных лабораторных исследований гепатита В был сформулирован примерный алгоритм патогенеза острого гепатита В из пяти стадий.

При комплексном лабораторном обследовании больного могут быть заранее выявлены характерные отклонения от оптимальных параметров индукции основных маркеров инфекции, ведущие к нарушению алгоритма острой инфекции. В перспективе со временем динамика основных вирусологических и иммунологических маркеров ВКЭ-инфекции будет широко изучаться с применением новых количественных методов иммуноферментного и ПЦР анализов. Клиническими лабораторными исследованиями будут охвачены не только острая циклическая инфекция, но также и распространенные случаи тяжелого необратимого осложнения острой инфекции, ее постепенной трансформации в хроническую инфекцию. Более детально станут изучаться факторы, ведущие к обострениям хронического клещевого энцефалита. На основе текущего анализа результатов лабораторного определения комплекса маркеров инфекции в динамике у лечащего персонала может сложиться более полное представление о развитии острой циклической инфекции, о вероятности развития тяжелой, необратимой острой инфекции или о начале развития пролонгированной или хронической инфекции клещевого энцефалита у пациента. В результате, объективно обоснованное прогнозирование осложнения инфекции может помочь лечащему врачу в своевременном назначении больному необходимого этиотропного лечения. Лабораторное обследование пациентов методами ИФА и ПЦР-анализа во время лечения больного и его выздоровления также целесообразно для контроля за эффективностью назначенного курса лечения.

7. МЕТОДЫ И СРЕДСТВА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

7.1. ИФА Е антигена ВКЭ и антител к нему

Для выявления инфицирования вирусом и установления диагноза клещевого энцефалита повсеместно используются лабораторные методы иммуноферментного анализа антигенов ВКЭ и антител к ним в сыворотке крови пациента. Анализ Е антигена ВКЭ также часто используется для определения инфицированности клеща, снятого с укушенных. Эти анализы основаны на реакции взаимодействия антиген – антитело с применением меченых ферментом антител для индикации результатов. В качестве примера ниже приводятся краткие описания иммуноферментых тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» для клинического лабораторного анализа вирусного антигена и антител к ВКЭ.

ИФА Е антигена ВКЭ. Тест-система предназначена для выявления ВКЭ в клещах и ликворе человека или животных и может быть использована в клинических и эпидемиологических исследованиях.

В наборе реагентов тест-системы фирма поставляет готовые для проведения анализа стрипированные планшеты с предварительно иммобилизованными антителами. Одностадийный анализ антигена состоит в совместном инкубировании исследуемого образца с конъюгатом моноклональных антител против Е антигена ВКЭ с пероксидазой в лунках стрипов с предварительно иммобилизованными антителами против ВКЭ. Реакционная смесь в лунках выдерживается во влажной камере 3 ч при 37°С или 16–20 ч при комнатной температуре. После удаления и промывки лунок от не связавшихся реагентов вирусный антиген в исследуемой пробе проявляется реакцией ферментного конъюгата с субстратом, дающим окрашенный раствор в течение 25–30 мин при комнатной температуре. Оптическая плотность субстрата, определяемая спектрофотометрически, пропорциональна концентрации анализируемого вирусного антигена. В наборах тест-систем от «Вектор-Бест» по желанию заказчика в качестве субстрата пероксидазы поставляются ОФД или ТМБ.

ИФА антител класса IgM к ВКЭ. Для анализа используются готовые к применению пластиковые планшеты или стрипы с предварительно иммобилизованными антителами к IgM человека. Образец исследуемой стократно разведенной сыворотки инкубируется в течение часа при 37°С в лунках планшеты с антителами к IgM человека для связывания суммарной фракции антител класса IgM из анализируемой сыворотки. По окончании времени инкубации не связавшиеся компоненты сыворотки удаляются, и планшета промывается. Для связывания с вирусоспецифическими антителами IgM на планшете антигенов ВКЭ и меченых антител проводится вторая инкубация планшеты с предварительно смешанным реагентом антигенов ВКЭ и конъюгатом МКА к ВКЭ с ферментом-пероксидазой при тех же условиях. После второго удаления и промывки не связавшихся компонентов наличие специфических антител класса IgM к ВКЭ в исследуемой сыворотке определяется последующим проявлением активности и измерением оптической плотности окрашенного субстрата конъюгированного фермента.

Тест-система укомплектована контрольными сыворотками и всеми реагентами, готовыми для работы, снабжена соответствующей инструкцией по применению.

ИФА антител класса IgG к ВКЭ. По желанию заказчика тест-системы комплектуются готовыми к работе планшетами или стрипами с заранее иммобилизованным антигеном ВКЭ. В соответствии с инструкцией разбавленная в 100 раз исследуемая сыворотка вносится в лунки планшеты с вирусным антигеном и инкубируется в течение часа при температуре 37°С. В конце инкубации не прореагировавшие компоненты сыворотки удаляются, и планшета промывается. Затем в лунки со связавшимися антителами вносится раствор ферментного конъюгата с моноклональными антителами против иммуноглобулинов класса IgG человека. Планшета с реагентами выдерживается во второй раз в течение часа при 37°С. После удаления и промывки не связавшихся реагентов количество вирусспецифических IgG в исследуемой сыворотке определяется последующим проявлением и измерением оптической плотности окрашенного субстрата ферментного конъюгата в лунках планшеты. Набор реагентов тест-системы и ее инструкция по применению предусматривают процедуру титрования вирусспецифических IgG в сыворотке.

Тест-система выпускается в соответствии с требованиями ВФС 42-3503-99 и ее производство сертифицировано как медицинского иммунобиологического препарата.

7.2. ПЦР-анализ РНК ВКЭ

Методом молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот с ПЦР геномная РНК ВКЭ определяется с применением молекулярных зондов – меченых фрагментов нуклеиновой кислоты, комплементарных к определенным участкам генома ВКЭ. Преимущества анализа РНК ВКЭ перед методом биопробы и анализом антигенов вируса иммуноферментным методом или методом флюоресцирующих антител стали очевидными с первых работ по выявлению РНК ВКЭ еще простым методом гибридизации нуклеиновых кислот [27, 28].

Первые результаты анализа РНК ВКЭ показали, что метод молекулярной гибридизации – более высокочувствительный тест: вирусная РНК выявлена из 50,9% исследованных проб крови больных с острым течением клещевого энцефалита. При исследовании тех же образцов крови методом биопробы на беспородных белых мышах инфекционный вирус выявлен в 23,4% случаев. По мнению авторов, столь значительное расхождение в результатах анализов в сыворотке объясняется возможной маскировкой инфекционного вируса за счет формирования иммунных комплексов. В процессе депротеинизации при выделении РНК из анализируемого образца нуклеопротеиновые комплексы диссоциируют, и освобождающаяся вирусная РНК увеличивает частоту положительных результатов гибридизационного анализа. Более частое выявление РНК ВКЭ в крови больных может быть обусловлено также значительно более активным, чем репликация инфекционных вирионов, синтезом вирусной РНК в инфицированной клетке. Чувствительность гибридизационного метода, по сравнению с биотестом, при анализе ВКЭ в клещах была выше и при постановке биотеста на сосунках белых мышей, но в меньшей степени.

ЗАО «Вектор-Бест» для анализа РНК ВКЭ в клинических образцах поставляет тест-систему ПЦР-анализа в его наиболее выскочувствительном варианте, основанном на методе обратной транскрипции с последующей «nested» полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Метод ОТ-ПЦР включает два этапа: на первом этапе при температуре 37°С производится реакция обратной транскрипции, т.е. после специфического связывания олигонуклеотида-праймера с вирусной РНК исследуемого образца происходит синтез вирусной кДНК с помощью обратной транскриптазы (ревертазы); на втором этапе проводится ПЦР, включающая три стадии. На первой стадии при температуре 93°С происходит денатурация

гибридной двойной цепи РНК-кДНК, образовавшейся при обратной транскрипции. На второй стадии ПЦР два олигонуклеотида-праймера, строго специфичные (гомологичные) к определенным участкам антипараллельных цепей вирусной РНК и кДНК, связываются с этими участками цепей нуклеиновых кислот (т.н. стадия отжига праймеров). На третьей стадии при температуре 70–72°С с участием термофильной ДНК-полимеразы (Tth-полимераза) и дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов происходит синтез новых цепей ДНК. Инициация синтеза ДНК происходит в местах связывания олигонуклеотидов-праймеров с вирусной РНК и кДНК, матрицей для копирования служат комплементарные цепи вирусной нуклеиновой кислоты (т.н. стадия полимеризации).

Таким образом, за цикл из трех стадий происходит удвоение каждого из двух фрагментов антипараллельных цепей вирусной нуклеиновой кислоты. При проведении 20 таких циклов теоретически происходит увеличение количества фрагмента исходной ДНК примерно в миллион раз.

Для увеличения чувствительности анализа этап ПЦР проводится в «nested»-варианте: первый раунд – с «внешней» парой олигонуклеотидов-праймеров, второй раунд – с «внутренней» парой олигонуклеотидов-праймеров и аликвотой реакционной смеси ПЦР первого раунда.

Выбранные пары праймеров из NS3-области вирусного генома позволяют выявлять строго специфично все РНК ВКЭ различных штаммов. При этом РНК других флавивирусов, в том числе – из антигенной группы ВКЭ, не выявляются. Размер специфического ампликона в первом раунде ПЦР с «внешними» праймерами – 340 пар оснований, во втором раунде ПЦР с «внутренними» праймерами – 171 пара оснований или нуклеотидных остатков. Детекцию результатов ПЦР-анализа проводят визуально после гель-электрофореза аликвоты амплифицированной ДНК в полиакриламидном геле или агарозе. Чувствительность анализа с применением описанной тест-системы – 100–200 геномов ВКЭ на исследуемую пробу. Сверхчувствительный ПЦР-анализ РНК позволяет надежно с высокой специфичностью выявлять ВКЭ в исследуемых образцах, содержащих вирус в десятки-сотни тысяч раз в меньших количествах, чем это позволяет выявлять ИФА-анализ антигена ВКЭ.

Для проведения лабораторного ПЦР-анализа РНК ЗАО «Вектор-Бест» выпускает дополнительный набор реагентов, специаль-

но предназначенный для выделения РНК из биологических образцов (крови, сывороток крови, форменных элементов крови, мочи, слюны, ликвора, соскобов со слизистой, культур клеток и пр.).

7.3. Лабораторная диагностика клещевого энцефалита

Внутри-, межочаговая и региональная генетическая гетерогенность ВКЭ приводит к широкому структурному разнообразию эпитопов каждого из антигенов вируса. В результате среди циркулирующих в природе штаммов вируса значительную часть составляют антигенно-дефектные варианты. Сущность явления антигенной дефектности заключается в отсутствии гемагглютинирующего и преципитирующего антигенов и слабой иммуногенности на фоне высокой инфекционной активности вируса. В этих условиях основу иммунологических методов анализа специфических вирусных антител составляют реакции связывания только вируснейтрализующих антител, продуцируемых у лиц, инфицированных антигенно-дефектными вирусами в низких титрах. В природных популяциях ВКЭ доля соответствующих дефектных штаммов может достигать 30–40% [29]. Лица, инфицированные антигенно-дефектными штаммами, в клинике образуют группу т.н. серонегативных больных и больных с низкими стабильными титрами.

При иммунологических методах определения ВКЭ некоторая неопределенность в оценке результатов анализа также возникает из-за того, что препараты меченых антител могут связываться с вирусами различных серотипов ВКЭ с разной эффективностью. Также требуется проверка специфичности меченых антител относительно реакции связывания с другими флавивирусами группы клещевого энцефалита. По этим причинам в последнее время в производстве ИФА-диагностикумов для клинического анализа в качестве меченых антител к ВКЭ используются моноклональные антитела, связывающиеся с определенным эпитопом Е-антигена ВКЭ, общим для известных серотипов этого вируса.

Клиническое распознавание клещевого энцефалита на первом этапе основывается на известных клинико-эпидемиологических данных. В большинстве наблюдений удается установить предшествующее пребывание человека в лесу, укус клеща или возможность употребления им сырого инфицированного молока. Сразу оценивается вероятная продолжительность инкубационного периода, а клинические исследования могут выявить нейроинфекционный характер

болезни. Предварительный диагноз должен быть подтвержден лабораторным методом [3]. На практике диагноз клещевого энцефалита, как правило, устанавливается применением ИФА при четырехкратном нарастании титра вирусспецифических антител в парных сыворотках. Повторное обследование можно провести спустя 7–10 дней. Обычно антитела в высоких титрах обнаруживаются на 10–14-й день болезни, а иногда и раньше, и достигают высокого уровня к концу месяца. Даже однократное определение высокой концентрации вирусспецифических иммуноглобулинов класса IgM следует считать достоверным свидетельством в пользу клинического диагноза клещевого энцефалита. Ранние антитела IgM в сыворотке пациентов выявляются, начиная с первых дней после укуса клеща. Чувствительность применения ИФА вирусспецифических антител класса IgM для диагностики максимальна в первой десятидневке после инфицирования. Антитела класса IgG в максимальных титрах выявляются в течение 2–6 мес. после инфицирования. Однако, следует учитывать отсутствие антител или весьма низкий уровень продукции их у части больных в титрах не выше 1:640. При этом следует иметь в виду возможность обнаружения специфических антител в низких титрах в течение длительного времени у вакцинированных. Поэтому для подтверждения диагноза часто рекомендуется применение высокочувствительного ПЦР-анализа для определения РНК ВКЭ. Определение вирусной РНК при клещевом энцефалите в образцах сыворотки, ликвора, в зависимости от сроков выявления и корреляции с определенными соотношениями уровней специфических антител IgM и IgG, может служить для диагностики серонегативной формы клещевого энцефалита, затяжной реконвалесценции, прогноза второй волны лихорадки клещевого энцефалита и возможности хронизации процесса [58, 82].

В последнее время ПЦР-анализ РНК ВКЭ, метод ИФА для индикации вирусного антигена в клещах, снятых с людей, все чаще применяются для прогноза риска заболевания клещевым энцефалитом. При положительных результатах тестирования рекомендуется экстренная серопрофилактика укушенного путем внутримышечного введения специфического противоэнцефалитного человеческого иммуноглобулина [59].

Дифференциальная диагностика должна учитывать возможность заболевания пациента японским энцефалитом, геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, энтеровирусным менингитом, клещевым риккетсиозом, болезнью Лайма (боррелиозом) и др.

8. СРЕДСТВА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

8.1. Средства вакцино- и серопрофилактики

За более, чем полувековую историю противостояния человека инфекции клещевого энцефалита были предложены и апробированы ряд широко распространенных мер как общей, неспецифической, так и специфической, или этиотропной, профилактики инфекции. Со временем практика постепенно меняет установившиеся оценки эффективности и перспективности всех этих методов и процедур.

Неспецифический метод профилактики инфекции путем уничтожения переносчиков вируса в природе был предложен еще в 1937–1938 гг. Лесные участки тогда предлагалось обрабатывать растворами лизола, нафталина и фенола. Однако, позже наиболее эффективными средствами борьбы с этой природно-очаговой инфекцией были признаны и широко применялись в качестве акарицидов длительного действия ДДТ (дихлордифенилтрихлорэтан) и ГХЦГ (гехсахлорциклогексан) путем наземного и воздушного, при помощи авиации, опыления их в форме дуста на больших лесных площадях и пастбищах во многих регионах в 60-е годы прошлого века. Была показана высокая эффективность препаратов против клещей. Однако, наравне с заметным снижением заболеваемости клещевым энцефалитом в ряде регионов страны, как показал и мировой опыт применения этих препаратов в сельском хозяйстве и здравоохранении, была подтверждена их недопустимая вредность и опасность для окружающей среды и здоровья людей. После запрета применения и производства этих ядохимикатов в настоящее время в России по медицинским показаниям продолжается противоклещевая обработка ограниченных территорий (летних детских оздоровительных лагерей, домов отдыха и санаториев) фосфорорганическими акарицидами короткого срока действия, такими, как карбофос, трихлофос и др. [80].

К эффективным средствам неспецифической профилактики клещевого энцефалита также относятся санитарно-просветительская работа и меры индивидуальной и коллективной защиты от нападения и присасывния клещей. Уже в первые годы изучения клещевого энцефалита было установлено, что при правильно ор-

ганизованных взаимных осмотрах в лесу до 96,6% наползших клещей удалялись до того, как они успевали присосаться [52]. Еще в 30–40 гг. была доказана эффективность использования специальной противоклещевой одежды и репеллентов. Считается, что необходимо применять отпугивающие средства, например, акарорепеллент мел «Претикс», даже если они не дают 100%-го эффекта.

Безусловно, наиболее эффективной и перспективной противоэнцефалитной защитой является повышение уровня иммунной прослойки населения и повышение сопротивляемости организма каждого индивидуума путем проведения специфической противовирусной вакцино- и серопрофилактики клещевого энцефалита. Первый образец вакцины против клещевого энцефалита был изготовлен на основе инактивированной формалином мозговой суспензии высоко репродуктивного дальневосточного штамма ВКЭ, накапливающегося в мозговой ткани зараженных в мозг белых мышей. После обоснования в эксперименте на белых мышах безвредности и иммуногенности препарата его авторы Е.Н. Левкович и А.А. Смородинцев проверили безопасность вакцины на себе, а в дальнейшем на 10 волонтерах – сотрудниках лаборатории в 1939 г. Прививки не вызывали побочных местных или общих реакций. Через 21 день после иммунизации у большинства привитых обнаруживался прирост вируснейтрализующих антител к ВКЭ. Тогда вакцина была разрешена для профилактических прививок участников дальневосточной экспедиции и населения Оборского очага клещевого энцефалита в крупном леспромхозе недалеко от г. Хабаровска. Учет заболеваемости в последующие 3 мес. показал высокую эффективность вакцинации. Среди 925 привитых было 2 легких случая энцефалита. В группе сравнения у непривитых лиц на 1185 человек было диагностировано 27 заболеваний, в большинстве тяжелых, в т.ч. с 7 летальными исходами.

Существенным недостатком инактивированных вакцин первых лет явилось значительное содержание в них балластной мозговой ткани мышей, и как следствие, случались единичные гиперэргические реакции на инородную ткань. Это явилось обоснованием для снижения содержания мозговой ткани в составе вакцины от 5 до 2,5% в 1958 г. Поскольку при массовой иммунизации убитой мозговой вакциной среди привитых в 1956–61 гг. было зарегистрировано 2 случая демиелинизирующего энцефалита, начались поиски более безопасных подходов, разработки новой вакцины.

Перспективным направлением поисков была выбрана технология производства вакцинного вируса на тканевой культуре и его инактивация формалином. В бывшем Советском Союзе в 1962–69 гг. было выполнено большое количество наблюдений по изучению эффективности инактивированной культуральной вакцины против клещевого энцефалита в различных очагах инфекции. В результате была рекомендована весьма громоздкая схема вакцинации из 7 прививок, расчитанных на срок 4–5 лет. К концу периода 5-летней иммунизации у значительных контингентов населения формируется полноценный иммунитет. Поскольку вакцинация проводилась среди населения высокоэндемичных районов, по мнению А.А. Смородинцева и А.В. Дубова, высокий протективный эффект вакцины достигался в результате дополнительной реиммунизации людей местными природными штаммами вируса с доминирующим бессимптомным инфицированием в естественных условиях [53].

По мнению этих авторов, изучение особенностей иммунитета, стимулируемого против ВКЭ с помощью инактивированных вакцин, свидетельствует о выраженной неполноценности создающейся защиты. Развивающийся общий гуморальный иммунитет кратковременен из-за быстрого падения уровня низкоавидных антител класса IgG. Клеточный иммунитет системы Т-лимфоцитов малоактивен в опытах адоптивного переноса этих клеток сингенным зараженным мышам. В то же время, предварительная иммунизация мышей инактивированной вакциной создает надежный грундиммунитет против штамма живого вируса, который утрачивает в этих условиях болезнетворные свойства, но стимулирует развитие высконапряженного иммунитета, подавляющего возможность реинфицирования животных вирусами любой вирулентности. При этом следует обратить внимание на то, что высокая профилактическая эффективность естественной вакцинации, по-видимому, может быть связана с поливалентным характером суммарного вирусного антигена, представляемого природным клещевым пулом ВКЭ.

Работы с такой предпосылкой по разработке живых вакцин на базе аттенуированных штаммов ТР-21 вируса Лангат и его антигенного близкого родственника штамма Эланцев ВКЭ из Сибири остались не завершенными. В этих работах не был достигнут оптимальный уровень аттенуации или ослабления патогенности вирусов-кандидатов в живые вакцины, позже сформулированный авто-

рами. По мнению разработчиков, живая вакцина при внутримозговом заражении обезьян не должна вызывать не только летальных исходов, но также клинических или патоморфологических признаков поражения ЦНС при высокой активности стимулирования ею напряженного и длительного гуморального иммунитета.

В настоящее время в сибирском регионе применяется инактивированная культуральная сорбированная на гидроокиси алюминия вакцина на основе штамма 205 ВКЭ производства НИИ вакцин и сывороток г. Томска. Полный курс вакцинации состоит из первичных трех инъекций и трех ежегодных однократных ревакцинаций. Вакцина имеет ограничивающие широкое применение противопоказания. Общепризнанно, что среди вакцинируемых регистрируются случаи клещевого энцефалита, однако, уровень заболеваемости у этой категории населения значительно ниже, чем у непривитых, и заболевания у привитых протекают легче. В то же время, в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН РФ был разработан метод концентрирования и очистки инактивированной культуральной вакцины ультрацентрифугированием и хроматографией. Наиболее эффективной схемой прививок с высокоочищенной, высококонцентрированной вакциной показано двухкратное введение ее в дозах по 0,5 мл с 6-месячными интервалами между прививками. В этом случае вируснейтрализующие антитела регистрировались в достаточно высоких титрах у 95% привитых. На российском рынке также известна инактивированная культуральная концентрированная вакцина против центрально-европейского энцефалита (западного генотипа ВКЭ) производства фирмы «Иммуно» из Австрии. Высокоочищенный методом непрерывного зонального ультрацентрифугирования препарат нанесен на гидроокись алюминия в качестве адъюванта и согласно регламента имеет эффективность около 97–98%. Применение этой вакцины не имеет медицинских противопоказаний и возрастных ограничений. Использование ее для массовой вакцинации населения в Австрии позволило снизить заболеваемость клещевым энцефалитом с относительно высоких показателей до спорадических случаев. Тем не менее инактивированные вакцины не свободны от принципиальных недостатков, как то: масштабное производство вакцины связано с инфекционными штаммами ВКЭ; остается риск неполноты инактивации вируса в готовом препарате; длительный курс иммунизации с введением нескольких доз вакцины.

По этим причинам продолжаются работы по поиску наиболее безопасных, высокоэффективных вакцин нового поколения на основе современных биоинженерных технологий. Генно-инженерные субъединичные вакцины предлагаются на основе экспрессирующего бакуловирусного вектора и в виде живой вакцины на основе рекомбинантного вируса вакцины и других поксвирусных векторов. Из живых рекомбинантных вакцин хорошими протективными свойствами против клещевого энцефалита в эксперименте на мышах обладает химерный вирус осповакцины, несущий гены ВКЭ C-preM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3 и экспрессирующий белки E и NS1 ВКЭ [62].

Также показана перспективность другого нового подхода профилактики клещевого энцефалита – с применением ДНК-вакцины. Как сообщается [69], получены ДНК-конструкции, содержащие гены E и NS1 ВКЭ, клонированием их в составе эукариотических экспрессирующих векторов pSVK3-E и pSVK3-ENS1, соответственно. Трансфекция клеток СПЭВ комплексом рекомбинантная ДНК – катионный липид сопровождается синтезом белков NS1 и NS3. Протективный эффект ДНК-вакцин тестировали в эксперименте на мышах линии BALB/c внутримышечным введением 5 раз по 100 мкг рекомбинантной ДНК и последующим заражением дозой 100 ЛД50 ВКЭ штамма Софьин. Прививки ДНК-вакцинами сопровождались существенным протективным эффектом от инфекции, причем наибольший эффект получен при иммунизации рекомбинантной ДНК, содержащей гены E и NS1 ВКЭ. В другой работе инокуляция при помощи генного ружья в эпидермальные клетки обезьян плазмидной ДНК, экспрессирующей PreM и E гены дальневосточного и западного штаммов ВКЭ, вызывает рост уровня вирусспецифических антител по ИФА и нейтрализующих вирус антител по тесту редукции бляшек. Титр антител у животных, привитых ДНК-вакциной, был таким же, как у животных, инокулированных соответствующей взрослому человеку дозой коммерческой инактивированной вакцины против клещевого энцефалита. Пассивный перенос сывороток от привитых ДНК-вакциной обезъян к мышам полностью защищал мышей от инфекции западным и дальневосточным штаммами ВКЭ [70].

Тем временем, вакцинация существующими препаратами охватывает весьма ограниченный контингент населения, и заболеваемость клещевым энцефалитом в Российской Федерации

продолжает расти. В этих условиях остается весьма актуальным применение процедуры экстренной серопрофилактики специфическими иммуноглобулинами против клещевого энцефалита лиц, подвергнувшихся присасыванию вирусофорного клеща. Показано, что пассивная иммунизация людей предварительно или сразу после укуса инфицированного клеща противовирусными антителами резко снижает заболеваемость клещевым энцефалитом и, как это подчеркивается, особенно снижает риск развития тяжелой нейроинфекции. Протективный эффект достигается при введении специфических иммуноглобулинов, по возможности, в ранние сроки в течение двух-трех суток с момента присасывания клеща. Необходимость экстренной серопрофилактики устанавливается лабораторным анализом присосавшегося к коже человека клеща на наличие вируса. Уровень вирусофорности клещей, снятых с людей, значительно выше, чем у их сородичей, собранных в лесу. Например, в 90-ые годы зараженность питавшихся на людях клещей составляла 30–34% в окрестностях Иркутска, 18–21% в окрестностях Ангарска и 29–50% вблизи Томска [52, 59]. Часто по желанию укушенного экстренная серопрофилактика производится еще до лабораторного выявления инфицированности присосавшегося клеща. Титр специфических антител в препаратах человеческих иммуноглобулинов, выпускаемых в России, по регламенту устанавливается не менее 1:80. В России также применяется препарат человеческих иммуноглобулинов против клещевого энцефалита FSME-BULIN производства фирмы «Immuno» с минимальным титром антител против ВКЭ 1:640. Эффективность процедуры с этим препаратом оценивается от 60 до 70% [40]. Этот высокотитражный препарат рекомендуется применять не только после укуса клеща, но также перед сезонным наступлением заболевания или перед возможной экспозицией. Защитное действие данного препарата проявляется через 24 часа и продолжается около 4 недель.

Перспективной мерой предварительной профилактики клещевого энцефалита представляется применение индукторов эндогенных интерферонов йодантипирина и амексина в форме таблеток. Если эти препараты берутся с собой в лес, то по обнаружении укуса клеща профилактическая таблетка может быть принята на месте. Однако эффективность такой экстренной профилактики нуждается в изучении.

8.2. Средства этиотропной терапии клещевого энцефалита

По мнению А.П. Иерусалимского клиническое течение клещевого энцефалита далеко не стереотипно. Первые 2–4 дня заболевания еще не определяют ее клиническую форму и тяжесть. Ведущим в это время часто является лишь общеинфекционный синдром, а неврологические проявления могут быть еще впереди. Следовательно, каждого больного в этом периоде следует воспринимать как потенциально тяжелого и лечить соответственно. Учитывая избирательный тропизм ВКЭ к моторным стуктурам ЦНС, необходимо в остром (лихорадочном) периоде болезни предельно ограничить двигательную активность больного строгим постельным режимом и транспортировкой на носилках (при необходимости) [1].

Растущая заболеваемость и реальность развития тяжелой острой или хронической инфекции клещевого энцефалита не оставляют сомнения в актуальности поиска новых средств и процедур лечения. С целью выздоровления пациента или ремиссии болезни разработан стандарт (протокол) лечения клещевого энцефалита, где решающая роль придается этиотропным средствам: иммуноглобулинам человека против клещевого энцефалита, противоэнцефалитной иммунной плазме, интерферону (реаферону) и рибонуклеазе [63]. Применение этих основных средств наравне с другими патогенетическими лекарственными препаратами дозируется в зависимости от формы проявления инфекции. Иммуноглобулины против ВКЭ прописываются для введения внутримышечно в течение 3-х дней: при лихорадочной и менингеальной формах болезни – по 3 мл, а при очаговой форме – от 6 до 12 мл в сутки. Реаферон и его ректальная свечевая форма виферон-250 прописываются только для лечения менингеальной формы инфекции в 10, 13, 16 и 19-й дни. При тяжелой менингеальной и очаговой формах инфекции дополнительно к иммуноглобулинам предписано применение противоэнцефалитной иммунной плазмы в течение трех дней и рибонуклеазы в течение 5–7 дней. При тяжелой менингеальной и очаговой формах болезни пациентам предписано одновременное лечение кортикостероидным иммунодепрессантом преднизолоном внутривенно в течение 3–7 дней.

Предусмотренная продолжительность стационарного лечения для лихорадочной формы инфекции средней тяжести – 14 дней, при менингеальной форме средней тяжести – 21 день, при тяжелой – 30 дней. При очаговых менингоэнцефалитической и полиомиели-

тической формах ВКЭ-инфекции средней тяжести – 35 дней, при тяжелой – 50 дней.

Несмотря на положительный клинический эффект и многолетний опыт использования специфических серопрепаратов для лечения клещевого энцефалита, по мнению авторов статьи [64], до настоящего времени в литературе появляются разноречивые сведения о возможных последствиях их применения. На Дальнем Востоке на долю клинических форм с тяжелым поражением мозга приходится более 50% случаев, из них в 25% случаев и более отмечается летальный исход. На территории Сибири доминируют лихорадочные и стертые формы, тяжело протекающие случаи клещевого энцефалита встречаются довольно редко. Результаты многочисленных наблюдений по использованию специфических иммуноглобулинов на разных территориях страны не всегда совпадают. Согласно методическим рекомендациям, разработанным в Омске, в тяжелых случаях при очаговых формах этой инфекции с поражением оболочки и вещества мозга максимальная курсовая доза иммуноглобулинов составляет до 60 мл. В то же время, дальневосточные клиницисты для таких случаев предлагают оптимальную схему с курсовой дозой до 120 мл. В этом плане клинические и экспериментальные исследования по обоснованию оптимальных схем применения специфических иммуноглобулинов с увеличением ранее рекомендованных курсовых доз препарата продолжаются.

Эксперименты по поискам оптимальных лечебных доз иммуноглобулинов на модели золотистых хомячков, инфицированных высоковирулентными дальневосточными штаммами ВКЭ Пищелкин и 155, свидетельствуют о значительных вариациях лечебного эффекта разных доз препарата. Прежде всего, отмечается ухудшение тех или иных показателей при воздействии меньшей лечебной дозы (0,1 мл препарата на животное, что соответствует 60 мл препарата для взрослого человека) иммуноглобулинов на оба штамма ВКЭ, использованных в опыте. Более глубокие патологические нарушения отмечены у хомячков, зараженных штаммом 155 и леченных иммуноглобулинами, особенно в малой дозе 0,1 мл. На основании этих данных в клинической практике у больных с признаками бульбарных нарушений и хотя бы минимальными симптомами, свидетельствующими о вовлечении в процесс ствола мозга, применение серотерапии оспаривается. Отчетливая картина эффективности иммунотерапии в дозе 0,2 мл была получена на модели

хомячков, зараженных менее вирулентным штаммом Пищелкин ВКЭ. Как подчеркивается авторами [64], назначение иммунопрепаратов в недостаточном количестве, а еще хуже с низкими титрами антител, как правило, может обусловить образование патогенных иммунных комплексов, которые способствуют формированию длительной персистенции вируса и хронизации инфекционного процесса. Как известно из патогенеза инфекции, такие комплексы образуются на ранних этапах инфекционного процесса, когда в крови присутствует лишь незначительное количество противовирусных антител. При увеличении концентрации циркулирующих антител количество комплексов с избыточным содержанием вируса уменьшается и полностью исчезает.

В связи с этим обращается внимание на применение низкотитражных препаратов иммуноглобулинов (1:20 и 1:40) для профилактики клещевого энцефалита с низкой протективной (5–14,4%) эффективностью. Такая практика может только дискредитировать специфическую экстренную иммунопрофилактику, по сути способствуя активизации инфекционного процесса или возникновению длительной персистенции вируса. Как отмечается, при применении высокотитражного австрийского препарата иммуноглобулинов против ВКЭ-инфекции из расчета 0,1 мл/кг массы в первые сутки и 0,2 мл/кг массы тела во 2–4-ые сутки после укуса клеща не было выявлено ни одного случая заболевания.

А.П. Иерусалимский в своей монографии [1] список выше упомянутых этиотропных средств лечения клещевого энцефалита расширяет индукторами интерферона ридостином, йодантипирином и амексином с описаниями схем их применения. Кроме того, для лечения больных с тяжелым течением клещевого энцефалита автором совместно с А.К. Ровиной, Л.О. Черницыной и др. разработан новый вариант серотерапии, сочетанный с гемосорбцией – экстракорпоральная иммуногемосорбция. На угольный сорбент СУМС-1 в пропорции 4:1 наносится противоэнцефалитный лечебный иммуноглобулин высокого титра. Затем через иммуногемосорбент вено-венозным споособом проводится гемосорбция со скоростью 80 мл/мин в объеме 1,0–1,5 ОЦК. Показаниями для новой лечебной процедуры являются данные клинические и лабораторные, говорящие о тяжести состояния больного: высокая лихорадка, нарушения сознания различной степени, судорожный синдром, содержания мочевины и билирубина, превышающие норму, высо-

кие цифры лейкоцитарного индекса интоксикации, концентрация молекул средней массы в крови более 0,26 удельных единиц. Метод клинически апробирован на 28 больных с тяжелым течением клещевого энцефалита (преимущественно менингоэнцефалитичской формы). По сравнению с простой гемосорбцией достигается гораздо большая эффективность: после однократной иммуногемосорбции определяется чистый фон по содержанию РНК ВКЭ в крови, в более короткий срок регрессировала неврологическая симптоматика, уменьшается степень нарушения сознания, продолжительность коматозного состояния.

9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Природно-очаговая нейровирусная инфекция клещевого энцефалита распространена по всей умеренно-климатической лесной и лесостепной зоне Евразийского континента и за его пределами, от японского острова Хоккайдо на востоке и до островов Великобритании на западе. Однако, наиболее высокоэндемичными по клещевому энцефалиту территориями являются Уральский, Сибирский и Дальневосточный регионы Российской Федерации. На южном и среднем Урале, юге Западной Сибири установлена наиболее высокая распространенность инфекции. На Дальнем Востоке клещевой энцефалит протекает в более тяжелой форме с частыми летальными исходами, а на юге Восточной Сибири наравне с высокой распространенностью инфекции характерна ее частая хронизация. Сезонное заболевание весенне-летнего энцефалита повсюду распространяется носителями вируса в природе – иксодовыми клещами. На европейской части территории основным носителем вируса является лесной клещ *I. ricinus*, а на азиатской части ареала – таежно-луговой клещ *I. persulcatus*.

На основании анализа многолетних клинических данных, полученных в своей работе по лечению больных клещевым энцефалитом, а также с учетом результатов многочисленных работ по повсеместному изучению особенностей этой нейроинфекции в течение десятилетий другими врачами, А.П. Иерусалимский приходит к заключению о том, что различия клиники клещевого энцефалита в разных отдаленных географических районах его ареала, различия клиники, связанные с особенностями ландшафта в близлежащих районах и изменение клиники заболевания в одном очаге с течением времени отражают собой единый процесс – эволюцию природно-очаговой инфекции.

Молекулярно-генетическое изучение ВКЭ показало гетерогенность и изменчивость вирусного генома. Широкая гетерогенность первичной структуры генома ВКЭ поддерживается пассированием вируса через организм членистоногих в процессе естественной циркуляции вируса по схеме клещ–животное-прокормитель–клещ. С гетерогенностью вирусного генома связана неоднородная антиген-

ная структура клещевого пула вируса в природном очаге инфекции. Штаммы вируса внутри каждого очага отличаются инфекционными, иммуногенными и иммуно- и нейропатогенными свойствами. И, как следствие, повсеместно наблюдается широкое разнообразие форм и клинических проявлений острого клещевого энцефалита: от латентных, субклинических, умеренных лихорадочных, менингеальных и до менингоэнцефалитических и полиомиелитических очаговых тяжелых форм энцефалита, а в некоторых местах – еще с развитием клинической инфекции с двухволновой лихорадкой. В то же время результаты широких молекулярно-эпидемиологических и серологических исследований инфекции показали наличие различных генотипов и соответствующих антигенных серотипов ВКЭ на удаленных друг от друга обширных территориях. Таким образом, достоверные отличительные особенности в клинических проявлениях инфекции, в тяжести ее протекания, ее хронизации и др. между различными удаленными друг от друга эндемичными регионами могли быть связаны с наличием эволюционных генотипических отличий возбудителя инфекции на фоне природно-очаговых особенностей клещевого пула вируса на территории.

Изучение доменных объемно-структурных и антигенно-эпитопных свойств поверхностного белка Е ВКЭ с применением рентгеноструктурных и МКА-исследований, идентификация специфических детерминант вирулентности с помощью сайт-направленных мутаций в гене Е в инфекционных кДНК клонах в эксперименте показали исключительно большую роль белка Е, как в определении клеточного тропизма, способности к индукции нейтрализующих и элиминирующих вирус из организма антител, так и в определении нейропатогенных свойств вируса. Применение технологии клонирования инфекционных кДНК в эксперименте для картирования детерминант нейроинвазивности и нейровирулентности ВКЭ на поверхности белка Е раскрывает молекулярные основы нейропатогенных свойств флавивирусов.

Изучение молекулярной биологии ВКЭ, выявление молекулярно-генетической гетерогенности клещевого пула вируса и его соответствующих патегенетических свойств, их изменчивости в результате пассирования вируса в клещах – носителях вируса и через позвоночных прокормителей инфицированного вирусом клеща, экспериментальное молекулярно-биологическое изучение мутационной природы изменчивости патогенетических свойств ВКЭ

позволяют предполагать, что выявленная эволюция клинических особенностей инфекции клещевого энцефалита связана, прежде всего, с эволюцией генома ее возбудителя и соответствующей антигенной структуры, иммуногенных свойств ВКЭ под воздействием быстро изменяющихся природных условий в антропургических очагах инфекции клещевого энцефалита.

В настоящее время явно отстает клиническое и экспериментальное исследование патогенеза ВКЭ-инфекции с применением современных лабораторных молекулярно-биологических, серологических и клинических иммунометрических методов. До сих пор нет результатов измерения динамики вирусологических антигенных, генетических и иммунологических маркеров с генотипированием иммуноцитов пациента в ходе инфекции, с одновременным прослеживанием индукции иммунорегуляторных цитокинов, интерлейкинов и других воспалительных и апоптозных медиаторов цитолиза инфицированных клеток и некроза тканей. Вследствие этого в литературе имеются только разрозненные отдельные сведения о репликативной, персистентной и интегративной инфекции, процессах иммуно- и нейропатологии, клеточно-гуморальном защитном иммунитете, об ассоциативных наследственных факторах и о стадиях острой и хронической ВКЭ-инфекции. Для составления единого вирусоиммуногенетического представления о патогенезе клещевого энцефалита прежде всего недостаточно информации о механизме персистентной инфекции. По-видимому, именно условия персистентной инфекции обеспечивают взаимную адаптацию вируса и макроорганизма на длительное сосуществование, переведя быструю репликативную инфекцию воспроизводства полноценного вируса на медленную персистентную инфекцию с продукцией дефектных интерферирующих вирусных частиц при условии длительной сохранности вирусного генома в инфицированной клетке и реализации механизма иммунной толерантности макроорганизма. Возможно, за перевод репликативной инфекции в режим персистентной инфекции ответственен еще не изученный участок клеточного генома человека, аналогичный локусу Flv у мыши, резистентной к флавивирусной инфекции.

Для решения практической задачи клинического прогноза развития и исхода инфекции клещевого энцефалита представляется целесообразным проведение широких лабораторных исследований комплекса вирусологических, иммунологических и биохимических маркеров инфекции в динамике с применением новых

методов ИФА и ПЦР-анализа, клинической иммунологии и биохимии. В результате могут быть установлены общие закономерности изменения маркеров инфекции и сформулирован оптимальный алгоритм развития последовательных стадий острой циклической инфекции клещевого энцефалита с учетом ее клинических особенностей. В дальнейшем, при комплексном лабораторном обследовании каждого пациента существенные отклонения или тенденции к отклонению динамических параметров основных маркеров в ходе инфекции от соответствующих характеристик оптимального алгоритма могут быть расшифрованы как вероятные предикторы необратимого осложнения острой инфекции или прогредиентного течения инфекции, ведущей к хроническому энцефалиту у больного.

Применение тест-систем ИФА и ПЦР-анализа соответствующих лабораторных маркеров клещевого энцефалита в настоящее время позволяет успешно разрешить задачи дифференциальной диагностики ВКЭ-инфекции. Методы ИФА-диагностики также могут быть использованы для изучения эффективности курса этиотропного лечения, скрининга населения с целью выявления лиц с иммунным статусом, не восприимчивых к ВКЭ-инфекции, и не нуждающихся в этиотропной профилактике. Средства пассивной и активной профилактики клещевого энцефалита, разработанные в России до сих пор, по своим качествам не отвечают полностью высоким требованиям, предъявляемым к ним в настоящее время. Работы по усовершенствованию технологии изготовления, поискам новых средств профилактики и лечения клещевого энцефалита продолжаются очень медленными темпами.

Финансовый аспект проблемы защиты от клещевого энцефалита для работающей части населения сегодня решается со стороны работодателей. Для остальной части населения предварительная активная вакцинопрофилактика и пассивная, экстренная серопрофилактика укушенных клещом от клещевого энцефалита может проводиться, в основном, за счет местных и централизованных бюджетных средств.

Растущая год от года заболеваемость клещевым энцефалитом, частые случаи тяжелого течения болезни и смертельные исходы при этом, постоянный рост числа инвалидов и лиц с ограниченными физическими возможностями с неизлеченным хроническим энцефалитом в России говорят о том, что до сих наше общество и государство не прилагают адекватных усилий для разрешения проблемы клещевого энцефалита в стране.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит. Руководство для врачей. Новосибирск. 2001.
2. Гайдамович С.Я. Клещевой энцефалит. Здоровье населения и среда обитания (1996), № 4, 19–22.
3. Шаповал А.Н. Клещевой энцефалит. Мед. газета № 50 от 01.07.94.
4. Якименко В.В., Дрокин Д.А., Калмин О.Б., и др. К вопросу о влиянии host-эффекта на штаммовую изменчивость вируса клещевого энцефалита. Вопр. вирусол. (1996) 3, 112–117.
5. Леонова Г.Н., Кожемяко В.Б., Исаева М.П., Майстровская О.С. Молекулярная характеристика популяции вируса клещевого энцефалита Южно-Сихотэ-Алиньского очагового региона. Там же. (1996), 4, 154–158.
6. Леонова Г.Н., Исачкова Л.М., Кругляк С.П., и др. Патогенетические критерии оценки вирулентности штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных на юге Дальнего Востока. Там же. (1995), 4, 165–169.
7. Карпова М.Р., Воробьева М.С., Кущ А.А., и др. Анализ стабильности некоторых свойств вируса клещевого энцефалита (штамм 205) при пассировании на мышах. Там же. (1995), 5, 205–208.
8. Labuda M., Jiang W.R. Kaluzova M. et al. Change in phenotype of tick-borne encephalitis virus following passage in Ixodes ricinus tick and associated amino acid substitution in the envelope protein. Virus Res. (1994), 31, №3, 305–315.
9. Злобин В.И., Мамаев Л.В., Джиоев Ю.П., Козлова И.П. Генетические типы вируса клещевого энцефалита. Тез.докл. Международной научной конференции «Вирусные, риккетсиозные и бактериальные инфекции, переносимые клещами» 24–26 сен. 1996г. Листвянка, Иркутск. Иркутск 1996, стр. 41–43.
10. Верхозина М.М., Злобин В.И., Горин О.З., и др. Характеристика генетического состава природной популяции вируса клещевого энцефалита Юга Восточной Сибири. Там же. Стр. 56–58.
11. Джиоев О.П., Злобин В.И., Демина Т.В., и др. Генетическая вариабельность вируса клещевого энцефалита в Азиатской части России. Там же. Стр. 59–60.

12. Злобин В.И., Мамаев Л.В., Джиоев Ю.П., и др. Молекулярно-биологические данные подтверждают генетическую самостоятельность Восточно-Сибирского подтипа вируса клещевого энцефалита (прототипный штамм Айна/1448). Там же. Стр. 61–62.
13. Козлова И.В., Злобин В.И., Мамаев Л.В., и др. «Лесопарк-11»-прототипный штамм Урало-Сибирского подтипа вируса клещевого энцефалита. Там же. Стр. 62–64.
14. Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. «Хронический клещевой энцефалит». «Наука» Сиб.отд. Новосибирск, 1986.
15. Mandl C.W., Guirakoo F., Holzmann H., et al. Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level using tick-borne encephalitis as a model. J.Virology. (1989), 63, 564–571.
16. Tsekhanovskaya N.A., Matveev L.E., Rubin S.G., Karavanov A.S., Pressman E.K. Epitope Analysis of Tick-borne Encephalitis Complex Viruses Using Monoclonal Antibodies to Envelope Glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype). Virus Research (1993), 30, № 1, 1–16.
17. Казанцев А.П., Матковский В.С. «Справочник по инфекционным болезням», «Медицина», М. 1986.
18. «Руководство по инфекционным болезням». Под ред. Покровского В.И., Лобана К.М. «Медицина», М. 1986.
19. Плетнев А.Г., Ямщиков В.Ф., Блинов В.М. Нуклеотидная последовательность генома и полная аминокислотная последовательность полипротеина вируса клещевого энцефалита. Биоорг. химия (1989), 15, № 11, 1504–1521.
20. Pletnev A.G., Yamshchikow V.F., Blinov V.M. Tick-borne Encephalitis Virus Genome. FEBS Lett. (1986), 200, 317–321
21. Mandl C.W., Heinz F.X., Kunz C. Sequence of the Structural Proteins of Tick-borne Encephalitis Virus (Western Subtype) and Comparative Analysis with Other Flaviviruses. Virology (1988), 166, 197–205.
22. Mandl C.W., Alison S.L., Holzman H. et al. Attenuation of TBEV by sructure-based site-specific mutagenesis of putative flavivirus receptor binding site. J. Virol. (2000), 74, № 20, 9601–9609.
23. Леонова Г.Н., Майстровская О.С., Борисевич В.Б. Антигенемия у людей, инфицированных вирусом клещевого энцефалита. Вопр. вирусол. (1996), 6, 260–263.
24. Злобин В.И., Мамаев Л.В., Джиоев Ю.П., Козлова И.В. Генетические типы клещевого энцефалита. Журн. инфекц. патол. (1996) 3, № 4, 13–17.

25. Mandl C.W., Heinz F.X., Stockl E., Kunz C. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. Virology. (1989), 173, 291–301.
26. Онищенко Г.Г. Распространение вирусных природно-очаговых инфекций в Российской Федерации и меры по их профилактике. Эпидемиология и инфекц. болезни (2000) № 4, 4–8.
27. Пищенко Н.Д., Кветкова Е.А., Шаманин В.А., Плетнев А.Г., Илюшенко Л.П. Применение метода молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот для диагностики клещевого энцефалита. «Клещевой энцефалит». Тр. Института им. Пастера. Том 65. Ленинград. 1989 г. Стр. 169–175.
28. Злобин В.И., Кветкова Э.А., Наволокин О.А. и др. Сравнение трех экспресс-методов индикации вируса клещевого энцефалита. Вопр. вирусол. (1990). 1, 57–59.
29. Бочкова Н.Г., Левина Л.С. Новое в диагностике клещевого энцефалита. Тез. докл. Международн. Научн. Конф. «Вирусные, риккетсиозные и бактериальные инфекции, переносимые клещами». 1996 г. Иркутск. Стр. 55–56.
30. Сафронов П.Ф., Нетесов С.В., Осипова Е.Г. и др. Полная нуклеотидная последовательность генома ВКЭ, штамм 205. Тез. докл. Всесоюзн. симпозиума «Современные проблемы эпидемиологии, диагностики и профилактики клещевого энцефалита». 1990 г. Иркутск. Стр. 10.
31. Леонова Г.Н., Майстровская О.С. Вирусемия у больных клещевым энцефалитом и у лиц с присасыванием иксодовых клещей. Вопр. вирусол. (1996). 5, 224–228.
32. Леонова Г.Н., Майстровская Г.С., Борисевич В.Б. Антигенемия у людей, инфицированных вирусом клещевого энцефалита. Там же. (1996). 6, 260–263.
33. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные представления о защите организма от инфекции. Иммунология (2000), N1,61–64.
34. Василенко А.М., Захарова Л.А. Цитокины в сочетанной регуляции боли и иммунитета. Успехи совр.биологии (2000), 120, № 2, 174–189.
35. Жданов В.М., Терентьев В.Ф., Фатеева А.П. и др. Интеграция генома вируса с геномом мозговых клеток при прогредиентном течении клещевого энцефалита. Вестн. АМН СССР (1977), № 7, 13–15.
36. Баринский И.Ф., Дерябин П.Г., Скорикова А.С. и др. Образование ДНК-провирусов в клетках перевиваемой лимфоидной линии человека при ее инфицировании вирусами клещевого энцефалита и кори. Докл. АН СССР (1978) 238, вып. 1, 236–239.

37. Маянский А.Н., Маянский Н.А. и др. Апоптоз: начало будущего. Ж. микробиол. (1997), № 2, 88–94.
38. Исаева М.П., Леонова Г.Н., Кожемяко В.Б. и др. Апоптоз как механизм цитопатического действия вируса клещевого энцефалита. Вопр. вирусол. (1998), вып.4, 182–186.
39. Черницына Л.О., Коненков В.И., Илюшенко Л.П., Прокофьев В.Ф. Ассоциированность аллельных вариантов генов HLA-комплекса класса I с интенсивностью гуморального иммунного ответа к антигенам вируса клещевого энцефалита в процессе заболевания. Иммунология (1994), вып. 6, 51–54.
40. Rice C.M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. Fields Virology. 3-d Edition ed. by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1996. p. 931– 959.
41. Monath T.P., Heinz F.X. Flaviviruses. Ibid. p. 961–1034.
42. Ahmed R., Morrison L.A., Knipe D.M. Persistence of viruses. Ibid. p. 219–249.
43. Ecker M., Allison S.T., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. J. Gen. Virology (1999) 80, 179–185.
44. Борисов В.А., Ющук Н.Д., Малов И.В., Аитов К.А. Особенности клещевого энцефалита в различных регионах. Эпидемиология и инфек. болезни (2000), № 2, 43–47.
45. Бахвалова В.Н., Рар В.А., Ткачев С.Е. и др. Генетический анализ штаммов вируса клещевого энцефалита Западной Сибири. Вопр. вирусол. (2000), вып. 5, 11–13.
46. Hayasaka D., Suzuki Y., Kariwa H., et al. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-eastern Russia. J.Gen.Virology (1999), 80, 3127–3135.
47. Волкова Т.Д.. Вольпина О.М., Иванов В.Т., Рубин С.Г., Семашко И.В., Караванов А.С. Изучение антигенной структуры вируса клещевого энцефалита с помощью синтетических пептидов. Биоорган. химия (1998), 24, № 2, 100–111.
48. Volkova T.D., Vorovitch A.B. Timofeev A.B., et al. Monoclonal antibody which recognize the predicted tick-borne encephalitis virus E protein fusion sequence bloks fusion. Arch.Virol. (1999), 144, № 5, 1035–1039.
49. Погодина В.В. М.П. Чумаков: посмертный вклад в изучение хронического клещевого энцефалита. Тез. докл. Международной научной конференции «Вирусные, риккетсиозные и бактериальные инфек-

ции, переносимые клещами» 24–26 сентября 1996 г. Листвянка, Иркутск. Иркутск 1996, стр. 102–103.
50. Черницына Л.О., Коненков В.И., Мусатов М.И., Иерусалимский А.П. Прогнозирование эффективности применения различных методов лечения клещевого энцефалита в остром периоде. Там же. Стр. 128–129.
51. Черницына Л.О., Коненков В.И., Иерусалимский А.П., Иванова Г.Г. Новые подходы к профилактике клещевого энцефалита на популяционном уровне с использованием иммуногенетических критериев (Первый опыт внедрения).Там же. Стр. 150–151.
52. Злобин В.И., Горин О.З. Клещевой энцефалит. «Наука», Новосибирск, 1996.
53. Смородинцев А.А., Дубов А.В. Клещевой энцефалит и его вакцинопрофилактика. «Медицина», Ленинград, 1986.
54. Леонова Г.Н., Исаева М.П., Кожемяко Б.В. и др. Итоги и перспективы изучения клещевого энцефалита на Дальнем Востоке. Тез. докл. Научной конференции «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера» 10–11 апреля 1998 г. Новосибирск 1998. Стр.3.
55. Исаева М.П., Леонова Г.Н., Борисевич В.Г. и др. Вирусспецифический антиген как ведущий индуктор апоптоза при клещевом энцефалите. Там же. Стр. 41–42.
56. Злобин В.И., Мамаев Л.В., Бутина Т.В., и др. Генотипирование вируса клещевого энцефалита на основе анализа гомологии фрагмента гена, кодирующего белок оболочки Е. Там же. Стр. 40–41.
57. Протопопова Е.В., Сорокин А.В., Качко А.В., и др. Ламининовый рецептор человека как клеточный рецептор для вируса клещевого энцефалита. Там же. Стр. 13.
58. Черницына Л.О., Епихина Т.И., Липатникова С.В., Алексеева Н.А., Гришаева О.Н., Гришаев М.П., Аммосов А.Д., Иерусалимский А.П. Использование в клинической практике выявления РНК вируса клещевого энцефалита методом ПЦР для диагностики острых и хронических форм клещевого энцефалита. Там же. Стр. 20–21.
59. Стронин О.В., Подоплекина Л.Е., Черный Н.Б. Результаты комплексного применения препаратов диагностики клещевого энцефалита и анализ механизмов отдельных реакций. Там же. Стр. 72–73.
60. Исачкова Л.М., Фисенко А.Ю., Леонова Г.Н. Патоморфологические аспекты дальневосточного варианта клещевого энцефалита. Там же. Стр. 42–43.

61. Бурмистрова Т.Г., Краснова Е.И., Толоконская Н.П., Гридина М.Н. Клинико-эпидемиологические аспекты клещевого энцефалита. Там же. Стр. 32–33.
62. Dmitriev I.P., Khromykh A.A., Ignatyev G.M., et al. Immunization with recombinant vaccinia viruses expressing structural and part of the nonstructural region of tick-borne encephalitis virus cDNA protect against lethal encephalitis. J.Biotechnology (1996), 44, 97–103.
63. Воробьева Н.Н., Главатских И.А., Мышкина О.К., Рысинская Т.К. Стандарты диагностики и лечения больных клещевым энцефалитом и иксодовыми клещевыми боррелиозами. Рос. мед. журн. (2000), № 4, 22–24.
64. Леонова Г.Н., Исачкова Л.М., Борисевич В.Г., Фисенко А.Ю. Экспериментальный клещевой энцефалит у золотистых хомячков на фоне специфической иммунотерапии. Вопр.вирусол. (2000), вып. 4, 28–33.
65. McMinn P.C. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. J. Gen. Virology (1997), 78, 2711–2722.
66. Mandl C.W., Ecker M., Holzmann H. et al. Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. Ibid. (1997), 78, 1049–1057.
67. Holzmann H., Stiasny K., Ecker M. et al. Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice. J. Gen. Virology (1997), 78, 31–37.
68. Pletnev A.G., Bray M., Lai C.J. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. J. Virology (1993), 67, 4956–4963.
69. Ткачев С.Е., Митрофанова Е.Э., Максимова Т.Г., Бахвалова В.Н., Морозова О.В., Власов В.В Сравнительный анализ защитного эффекта ДНК-вакцин с различными генами клещевого энцефалита. Иммунология (2000), № 3, стр. 26–29.
70. Schmaljohn C., Custer D., Zanden L.V., Spik K., et al. Evaluation of Tick-Borne Encephalitis DNA Vaccines in Monkeys. Virology (1999), 263, 166–174.
71. Аммосов А.Д. Гепатит В. (2000), пос. Кольцово. Институт средств медицинской диагностики ЗАО «Вектор-Бест».
72. Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., et al. The envelope glicoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2A resolution. Nature (1995), 375, 291–298.
73. Mandl C.W., Holzmann H., Kunz C., Heinz F.X. Complete genomic sequence of Powassan virus: evaluation of genetic elements in tick-

borne versus mosquito-borne flaviviruses. Virology (1993) 194, 173–184.
74. Silvia O.J., Shellam G.A., Urosevic N. Innate resistance to flavivirus infection in mice controlled by FLV is nitric oxide independent. J. Gen. Virology (2001), 82, 603–607.
75. Толоконская Н.П., Непомнящих Г.И., Коненков В.И., Нетесов С.В. Молекулярно-генетические и морфологические маркеры в условиях персистенции в организме РНК-вируса гепатита С. Бюлл. эксп. биологии медицины (2001), 131, № 2, 178–183.
76. Морозова О.В. Свойства некоторых белков вируса клещевого энцефалита. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Кольцово, 2001.
77. 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), вып.1, 12-16.
78. Злобин В.И., Демина Т.В., Беликов С.И. и др. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа уровней гомологии фрагмента гена белка оболочки. Там же. 17-22.
79. Злобин В.И., Газо М.Х., Беликов С.И. и др. Молекулярные зонды для генетического типирования вируса клещевого энцефалита. Там же. Вып. 4, 43-47
80. Салдан И.П., Прейдер В.П., Безруков Г.В. Заболеваемость клещевым энцефалитом в Алтайском крае. Эпидемиология инф.болезни. (2000), вып. 6, 14-15.
81. Жданов В.М. Эволюция вирусов. Москва, Медицина 1990 г.
82. Топычканова Н.Г., Рукавишников М.Ю., Гришаева О.Н. Диагностика клещевого энцефалита. Бюллетень «Новости «Вектор-Бест» (1999), № 11, 4–6.

СОДЕРЖАНИЕ

1. ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА 3
2. ЭТИОЛОГИЯ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ИНФЕКЦИИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА 6
2.1. Возбудитель инфекции и его переносчики в природе 6
2.2. Распространенность клещевого энцефалита 10
3. ПРОЯВЛЕНИЯ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ЕГО ПОСЛЕДСТВИЯ 13
3.1. Острая инфекция 13
3.2. Хроническая инфекция 17
4. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА 18
4.1. Морфология и структурно-функциональные характеристики флавивирусов 18
4.2. Организация генома ВКЭ и экспрессия структурных и неструктурных вирусных белков 19
4.3. Структура и функции белка Е 23
4.4. Репликативный цикл флавивирусов.....27
5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ НЕОДНОРОДНОСТЬ И ПАТОГЕННОСТЬ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА 32
5.1. Генотипы и серотипы вируса 32
5.2. Клинические особенности клещевого энцефалита по регионам распространения 41
5.3. Молекулярные основы нейровирулентности вируса 47
5.4. Молекулярно-генетическая гетерогенность изолятов вируса и их патогенность 52
6. ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕНЕЗА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА 60
6.1. Репликативная, персистентная и интегративная инфекции 60
6.2. Размножение вируса в организме и особенности развития инфекции 64
6.3. Иммунитет и цитопатические механизмы инфекции 68
6.4. Патоморфология нейроинфекции острого и хронического клещевого энцефалита 73

6.5. Экспрессия антигенов HLA-комплекса и гуморальный иммунитет ВКЭ-инфекции 78
6.6. Развитие общей концепции патогенеза клещевого энцефалита и прогноз исхода инфекции 81
7. МЕТОДЫ И СРЕДСТВА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ 87
7.1. ИФА Е антигена ВКЭ и антител к нему 87
7.2. ПЦР-анализ РНК ВКЭ 89
7.3. Лабораторная диагностика клещевого энцефалита.....91
8. СРЕДСТВА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА 94
8.1. Средства вакцино- и серопрофилактики 94
8.2. Средства этиотропной терапии клещевого энцефалита 100
9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ 104
ЛИТЕРАТУРА.....108

Дорогие читатели!

Свои критические замечания по обзору, пожелания по изменению его содержания, оформления просим посылать автору по E-mail: *vbmarket@vector-best.ru*

А.Д. Аммосов

КЛЕЩЕВОЙ ЭНЦЕФАЛИТ

Информационно-методическое пособие

Бумага офсетная. Формат 60×84/16.
Усл. печ. л. 7,25. Уч-изд. л. 7,3. Тираж 3 000.

Отдел оперативной печати ЗАО «Вектор-Бест».
630559 Новосибирская обл., п. Кольцово, а/я 121.