

- ровский НИИ ЭМ, 2004. – 49 с.
- Воронкова Г.М. Научные исследования по клещевому энцефалиту в Хабаровском крае и их практическая реализация / Г.М. Воронкова, Т.А. Захарычева, Т.П. Владимирова // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2007.- № 11. – С. 7-18.
8. Гуляева С.Е. Клещевой энцефалит: принципы диагностики, лечение. Монография / С.Е. Гуляева, А.А. Овчинникова, Н.Б. Афанасьева, С.А. Гуляев. – Владивосток: Изд-во «Усури», 2004. – 154 с.
 9. Захарычева Т.А. Новые и возвращающиеся клещевые природноочаговые инфекции в Хабаровском крае / Т.А. Захарычева // Национальные приоритеты России. Спец. выпуск. - № 2, 2009. – С. 68-69.
 10. Злобин В.И. Актуальные вопросы эпидемиологии и современные подходы к профилактике клещевого энцефалита в Российской Федерации / В.И. Злобин, Д.К. Львов, А.А. Иванова // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2007.- № 11. – С. 102.
 11. Доблер Г. Изучение клещевого энцефалита в научно-исследовательском проекте «Арбовирусы» / Г. Доблер, Ф. Хуферт // Медицина в Кузбассе: Спецвыпуск № 5-2008: Актуал. пробл. клещевых нейроинфекций. Матер. межрегион. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Кемерово: ИД «Медицина и просвещение», 2008. – С.49-51.

**В.И. Злобин^{1,2}, Т.В. Демина³,
М.М. Верхозина³, Ю.П. Джигоев³,
И.В. Козлова^{1,3}, С.Е. Ткачев⁴,
Е.К. Дорощенко³, О.В. Лисак³**

АНТИГЕННЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТИПЫ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФА- ЛИТА

¹ ГОУ ВПО Иркутский государственный медицинский университет

² ГУ НИИ вирусологии имени Д.И. Ивановского РАМН, Москва;

³ Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗСиРЧ СО РАМН, Иркутск

⁴ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Новосибирск

Современные тенденции использования в изучении вирусов преимущественно молекулярно-биологических методов оттеснили на второй план работы посвященные их фенотипическим характеристикам и, в частности, антигенным особенностям. Это в полной мере относится и к вирусу клещевого энцефалита (КЭ). Тем временем, антигенные свойства вирусов, выявляемые в серологических реакциях, дают ценную информацию с позиций оценки их природной вариабельности, а также эффективности используемых в практике диагностических и профилактических средств. Применительно к КЭ – это вопросы, относящиеся к уровню специфичности диагностических препаратов для выявления антигенов и антител, защитному спектру вакцин, приготовленных из разных штаммов и иммуноглобулинов, предназначенных для лечения и экстренной профилактики. Нет никаких сомнений в высокой ценности данных молекулярно-биологических исследований, позволяющих устанавливать различия или сходство вирусных изолятов на уровне геномных структур, по-новому характеризовать структуру природных популяций вируса, вопросы таксономии и классификации, этиопатогенеза. Однако наилучшие результаты с нашей точки зрения может дать комплексный

подход к проблеме variability возбудителя КЭ, включающий исследования как генетических, так и антигенных свойств вируса.

Еще в 1960-е годы D.H. Clarke [9] в реакции торможения геагглютинации с адсорбированными антисыворотками было показано, что вирус КЭ представлен, по крайней мере, двумя серотипами – западным и восточным. Долгое время считалось, что западный серотип циркулирует в природных очагах зарубежной Европы и на западе бывшего СССР, а восточный – на большей части его территории, включая восточные районы европейской части. Западный серотип вируса КЭ ассоциировали с переносчиком – клещом вида *Ixodes ricinus*, а восточный серотип – с клещом *Ixodes persulcatus*. Н.Н. Краминская и др. [6] в 1965 году обнаружили в Восточной Сибири (Иркутская область) оригинальный штамм вируса КЭ Айна/1448, который они первоначально приняли за западный вариант вируса, но позже оказалось, что он отличается как от западного, так и от восточного серотипа. В 1975 году М.П. Чумаков и др. [8] описали новый серотип вируса КЭ – греческий штамм Вергина, несколько позже С.Г. Рубин, М.П. Чумаков [10] в реакции диффузной преципитации в агаре (РДПА) с перекрестно адсорбированными сыворотками показали антигенную самостоятельность штамма Айна/1448. Таким образом, этими авторами выделено 4 серотипа вируса КЭ: 1) восточный

(дальневосточный), 2) западный, 3) Вергина, 4) Айна/1448. В.В. Погодина и соавт. [7] установили широкое распространение штаммов, гомологичных Айна/1448, в ряде регионов Сибири. Согласно авторам, данные штаммы образовали восточно-сибирский (среднесибирско-забайкальский или сибирский) серотип. Нами [1] с помощью реакции связывания комплемента с «растворимыми» антигенами ряда штаммов вируса КЭ был выделен урало-сибирский антигенный подтип (прототипный штамм Лесопарк-11). Анализируя данные литературы и собственных исследований, мы не могли не отметить, что выделение различных серотипов (антигенных подтипов) в этих работах основывалось на неодинаковых методических приемах и критериальных оценках. В дальнейшем мы предпринимали попытки стандартизировать подходы к характеристике антигенных различий вируса КЭ.

Прототипные штаммы описанных выше серотипов мы использовали для получения экспериментальных кроличьих иммунных сывороток. Затем из штаммов были приготовлены концентрированные полиэтиленгликолем антигены, с помощью которых осуществили перекрестную адсорбцию сывороток. Полученные таким образом адсорбированные сыворотки изучали в РДПА с набором концентрированных антигенов (табл. 1).

Таблица 1

Результаты определения антигенных различий прототипных штаммов вируса КЭ в РДПА с перекрестно адсорбированными сыворотками

Серотип Штамм	Антисыворотки, адсорбированные штаммами вируса КЭ различных серотипов															
	Сыв. штамма Софьин, серотип Д-Вост. + Ag				Сыв. штамма 256, серотип западный + Ag				Сыв. штамма Айна/1448, серотип Вост.-Сиб. + Ag				Сыв. шт. Лесопарк-11, серотип Урало-Сиб. + Ag			
	Ag Соф	Ag 256	Ag Айна	Ag Лес	Ag Соф	Ag 256	Ag Айна	Ag Лес	Ag Соф	Ag 256	Ag Айна	Ag Лес	Ag Соф	Ag 256	Ag Айна	Ag Лес
ДВ., Соф.	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Зап., 256	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
В-С, Айна	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
У-С, Лес.	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-

Результаты опытов продемонстрировали четкую дифференциацию штаммов Софьин (ДВ серотип), 256 (западный серотип) и Айна/1448 (В-С серотип). Штамм Лесопарк-11 (У-Сиб. серотип) продемонстрировал некоторое сходство со штаммом 256 и близкую степень антигенного родства со штаммом Айна/1448.

Основываясь на полученных результатах, свидетельствующих о возможности антигенной дифференциации вируса КЭ, нами было предпринято исследование методом РДПА с перекрестно адсорбированными сыворотками 50 штаммов, изолированных из различных источников и географических районов России. Данные этих опытов свидетельствовали о проблематичности в ряде случаев выявить тот или иной серотип вируса. Приблизительно 60% изученных штаммов проявляли ту или иную степень родства со штаммами Айна/1448 и Лесопарк-11, а чаще – с тем и другим одновременно. В большинстве случаев однозначная дифференциация штаммов в данной реакции не удавалась из-за близости антигенной структуры штаммов Лесопарк-11, Айна/1448 и 256. Эти данные побудили нас предпринять масштабное исследование генетических различий вируса КЭ на территории страны с целью комплексной характеристики штаммов.

Ранее нами с помощью секвенирования фрагмента гена белка Е 29 штаммов вируса КЭ [2, 3] были установлены три основных генотипа (1, 2 и 3), которые соответствовали дальневосточному, западному и сибирскому серотипам. Было сделано предположение о существовании еще двух генотипов (4 и 5), отличавшихся по последовательностям нуклеотидов от упомянутых трех основных. Однако в изученной выборке было обнаружено лишь по одному штамму – представителю данных генотипов (178-79 и 886-84).

Для сравнения структур геномов использовали разработанную нами панель дезоксирибонуклеотидных зондов, предназначенную для изучения генетической вариабельности и генотипирования больших выборок штаммов вируса КЭ. Панель состоит из 40 зондов и позволяет оценивать индивидуальную генетическую структуру каждого

штамма. Мишенями для зондов являются вариабельные, специфичные для каждого из трех основных генотипов последовательности всех 10 генов. С помощью указанной панели методом молекулярной гибридизации (МГНК) исследовали 247 коллекционных штаммов, выделенных на эндемичных территориях России.

В ходе тестирования штаммы разделились на 5 групп, соответствующих описанным нами пяти генотипам. В группе генотипа 1 оказалось 40 штаммов (16,2%), в группе генотипа 2 – 16 (6,5%), генотипа 3 – 180 штаммов (72,9%). В четвертую группу вошел единственный штамм 178-79, представляющий генотип 4 (0,4%), а пятую группу составили 10 штаммов (4%), среди которых оказался уникальный штамм 886-84, идентифицированный ранее как представитель генотипа 5. Штаммы «группы 886» характеризовались реактивностью с зондами генотипа 1 (штамм Софьин) с частотой 25% (с РНК этих штаммов реагируют 3 из 12 зондов, специфичных для генотипа 1). При этом, во всем обследованном ареале установлена циркуляция вариантов вируса генотипа 1 с реактивностью в пределах от 42 до 100%. Для трех штаммов «группы 886» нами были получены фрагменты геномов длиной 2194 н.о., кодирующие большую часть белков Е и NS1 (EU878283, EU878282, EU878281). При сравнении этих фрагментов с соответствующим участком штамма 886-84 (EF469662) выявлен высокий уровень гомологии (99,4-99,8%) всех четырех последовательностей. Все штаммы данной группы выделены на территории Восточной Сибири, в районах, где регистрируются тяжелые формы КЭ.

Материалы географического распространения генотипов вируса КЭ дополняют и согласуются с ранее опубликованными нами данными [4]. Как следует из табл. 2, генотип 3 доминирует на большей части обследованной территории, штаммы генотипа 2 выявлены преимущественно на Алтае (5 из 8) и относительно редко в Восточной Сибири (5 из 165). Представители генотипа 1 встречаются повсеместно, но преобладают на Дальнем Востоке.

Таблица 2

Географическое распространение генотипов вируса КЭ на территории РФ по результатам типирования в МГНК с 40 зондами

Регион	Генотип					
	Все генотипы	1	2	4	3	5
Центр, северо-запад и запад РФ	20	6 (30,0)	4 (20,0)	10 (50,0)	-	-
Предуралье	23	3 (13,0)	2 (8,7)	18 (78,2)	-	-
Западная Сибирь	24	3 (12,6)	5 (20,8)	16 (66,6)	-	-
Восточная Сибирь	165	19 (11,5)	5 (3,0)	130 (78,9)	1 (0,6)	10 (6,0)
Дальний Восток	15	8 (53,3)	-	7 (46,7)	-	-
Всего	247	40 (16,2)	16 (6,5)	180 (72,9)	1 (0,4)	10 (6,0)

Примечание: в скобках – проценты.

Таким образом, с помощью генотипирования на разных эндемичных территориях четко выявляются штаммы, относящиеся к одному из трех основных генотипов. На территории Восточной Сибири обнаружена группа штаммов вируса КЭ, отличающаяся от трех основных генотипов («группа 886»). К настоящему времени полностью расшифрована нуклеотидная последовательность генома данного штамма [5]. Отмечено его своеобразие, проявляющееся в чередовании аминокислот, характерных для двух и трех генотипов в пределах одного гена. Статус отдельного генотипа «группы 886» вируса КЭ подтверждается следующими фактами:

- штаммы из «группы 886» имеют необычную для генотипа 1 картину гибридизации;
- среди них присутствует, собственно, штамм 886-84, который: а) на основании расшифровки структуры фрагмента гена E (160 н.о.) типирован как уникальный; б) по аминокислотному составу этого же фрагмента отнесен к генотипу 3; в) по серологическим свойствам охарактеризован как занимающий промежуточное положение между двумя серотипами вируса КЭ – восточно-сибирским и дальневосточным или обладающий свойствами обоих серотипов;

- уровень гомологии фрагментов генома исследованных штаммов из «группы 886» длиной 2194 н.о. составляет более 99%, а отличия от других групп штаммов (генотипов 1, 2 и 3) на участке в 160 н.о. – не менее 12%, что соответствует ранее установленным критериям генотипирования [2];

- штаммы «группы 886» выделены из разных источников (грызуны и клещи) в разные годы (1983-1990) с разных территорий Восточной Сибири, т.е. занимают определенный ареал.

Вопрос о происхождении штаммов «группы 886» представляется весьма важным для понимания механизмов изменчивости вируса КЭ. Полученные данные позволяют сделать следующее предположение: структура геномов этих штаммов – результат ряда последовательных множественных рекомбинаций между геномными молекулами трех генотипов вируса КЭ. Дополнительные исследования могут подтвердить или опровергнуть эту гипотезу. Уже имеющиеся совокупные данные антигенных и генетических исследований свидетельствуют также о перспективности изучения данных штаммов в качестве кандидатов для усовершенствования диагностических и профилактических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злобин В.И., Дрокин Д.А., Мансуров П.Г. и др. Типирование штаммов вируса клещевого энцефалита по растворимому антигену // *Вопр. вирусол.* 1991. № 1. С. 24-27.
2. Злобин В.И., Демина Т.В., Беликов С.И. и др. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа гомологии фрагмента гена белка оболочки // *Вопр. вирусол.* 2001. № 1. С. 16-21.
3. Злобин В.И., Демина Т.В., Мамаев Л.В. и др. Анализ генетической variability штаммов вируса клещевого энцефалита по первичной структуре фрагмента гена белка оболочки E // *Вопр. вирусол.* 2001. № 1. С. 2-16.
4. Злобин В.И., Беликов С.И., Джигоев Ю.П. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. - Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН. 2003. - 271 с.
5. Карань Л.С., Браславская С.И., Мязин А.Е. Развитие методов детекции и генотипирования вируса клещевого энцефалита на основе амплификационных технологий // *Вопр. вирусол.* 2007. № 6. С. 17-22.
6. Краминская Н.Н., Живоляпина Р.Р., Мейерова Р.А., Перевозников В.А. Своеобразный штамм вируса клещевого энцефалита, выделенный от больного с прогрессивным течением заболевания // *Актуальные проблемы вирусных инфекций.* М. 1965. С. 190-191.
7. Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Левина Л.С. и др. Иммунологические и некоторые этиологические аспекты изучения серотипа Айна/1448 вируса КЭ // *Вопр. вирусол.* 1981. № 6. С. 735-741.
8. Чумаков М.П., Рубин С.Г., Линев М.Б. Три антигенных типа вируса клещевого энцефалита, их зависимость от основных видов клещей-переносчиков и географическое распространение // *М.* 1975. С. 371-372.
9. Clarke D.H. Antigenic analysis of strains group B arthropod-borne viruses by antibody absorbtion// *J. Exp. Med.* 1960. Vol. 111. P. 21.
10. Rubin S.G., Chumakov M.P. New data on the antigenic types of tick-borne encephalitis virus // *Arboviruses in the Mediterranean Countries.* Ed. By J. Veseniak Hirijan. Stutgardt, New-York: Fisher. 1980. P. 231-236.