

сколько иную картину. Исследуемые штаммы также формируют две группы (рис. 3), как и в случае анализа последовательностей, соответствующих структурному N-белку S-сегмента. Одна группа представлена европейскими штаммами со 100% идентичностью прототипному штамму Bardos. К другой группе, помимо штаммов из Казахстана, Таджикистана и Азербайджана, относится также китайский штамм XJ0708 со степенью филогенетического родства с прототипным штаммом Bardos, соответствующей около 98,5% гомологии. При этом каждый из исследованных азиатских штаммов оказался уникальным как по нуклеотидной, так и по аминокислотной последовательности.

Из результатов филогенетического анализа, проведенного по кодирующим нуклеотидным последовательностям S-сегмента, а также по участкам M-сегмента, видно, что все исследуемые штаммы достаточно близки прототипному штамму Bardos и являются штаммами вируса Тягиня.

В данной работе мы сравнили также нуклеотидные последовательности исследуемых штаммов между собой по сегментам генома S и M. Результаты анализа по нуклеотидным последовательностям S-сегмента (без 3'- и 5'-нетранслируемых областей), а также по участкам M-сегмента показали, что штаммы разделились на две группы (см. рис. 1–3). В первую группу вошли штаммы, выделенные в Чехословакии, Финляндии и Армении, – P6b, T-16, CT-39, La 65, 129 M3, 251 H2, 2014 M3, 7643 M3, 2008, Yerevan. Вторая группа представлена штаммами, выделенными в Азии, – Az-F, Kaz-5957, 525.

Таким образом, проведенные исследования показали, что географические изоляты следует рассматривать как варианты вируса Тягиня. Исследуемые штаммы разделились по географическому признаку; штаммы, формирующие отдельную азиатскую генетическую группу, существенно отличаются от штаммов, циркулирующих в Европе.

Авторы выражают глубокую благодарность В. Л. Громашевскому, З. Губалеку, В. А. Казаряну, Я. Капецки, С. К. Каримову и Отделу вирусологии Хельсинкского университета за предоставление использованных в данной работе штаммов вируса Тягиня.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Демихов В. Г. Клинико-эпидемиологическая характеристика заболеваний, вызываемых вирусами Инк и Тягиня (по результатам исследований, выполненных в Рязанской области): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М.; Рязань, 1992.
2. Колобухина Л. В., Львов С. Д. Калифорнийский энцефалит // Медицинская вирусология / Под ред. Д. К. Львова. – М.: МИА, 2008. – С. 540–541.
3. Лебедева С. Д. Вирусы калифорнийской серогруппы (Bunyaviridae, Bunyavirus): антигенная классификация и идентификация малоизученных штаммов: Дис. ... канд. биол. наук. – М., 1994.
4. Львов Д. К., Клименко С. М., Гайдамович С. Я. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. – М.: Медицина, 1989. – С. 212–214.
5. Bardos V., Danielova V. The Tahyna virus – a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia // J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. (Praha). – 1959. – Vol. 3. – P. 264–276.
6. Bishop D. H. L. Molecular biology of Bunyaviruses and Phleboviruses // Abstracts of the 2-nd Symposium on Arboviruses in Mediterranean Countries. – Dubrovnik, 1989.
7. Butenko A. M., Galkina I. V., Kusnetsov A. A. et al. Serological evidence of the distribution of California serogroup viruses in the USSR // Arch. Virol. – 1990. – Suppl. 1. – P. 235–241.
8. Butenko A., Lvov D., Kolobukhina L. Arboviruses of the genus Bunyavirus (family Bunyaviridae) and caused illnesses in the former USSR // Sov. Med. Rev. E: Virology Reviews. – 1993. – Vol. 5. – P. 77–135.
9. Calisher C. H. Taxonomy, classification, and geographic distribution of California serogroup Bunyaviruses // Prog. Clin. Biol. Res. – 1983. – Vol. 123. – P. 1–16.
10. Chandler L. J., Hogge G. et al. Reassortment of La Crosse ad Tahyna Bunyaviruses in Aedes triseriatus mosquitoes // Virus Res. – 1991. – Vol. 20, N 2. – P. 181–191.
11. Fazakerley J. K., Gonzales-Scarano F. et al. Organization of the middle RNA segment of snowshoe hare Bunyavirus // Virology. – 1988. – Vol. 167. – P. 422–432.
12. Fuller F., Brown A. S., Bishop D. H. Bunyavirus nucleoprotein, N, and a non-structural protein, NSs, are coded by overlapping reading frames in the S RNS // J. Gen. Virol. – 1983. – Vol. 64, Pt 8. – P. 1705–1714.

Поступила 24.11.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012  
УДК 578.833.26:578.53].083.2

**В. В. Погодина<sup>1</sup>, Л. С. Карань<sup>2</sup>, Н. М. Колясникова<sup>1</sup>, С. Г. Герасимов<sup>1</sup>, Л. С. Левина<sup>1</sup>, Н. Г. Бочкова<sup>1</sup>,  
Е. И. Андаев<sup>3</sup>, А. Г. Трухина<sup>3</sup>, Т. И. Борисова<sup>3</sup>, Е. А. Сидорова<sup>3</sup>, О. А. Нагибина<sup>3</sup>, Г. В. Маленко<sup>1</sup>, Е. Г. Безрукова<sup>1</sup>**

## Политиповые штаммы в генофонде вируса клещевого энцефалита

<sup>1</sup>Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН, Московская обл.; <sup>2</sup>ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ, Москва; <sup>3</sup>Иркутский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора

В европейской и азиатской частях ареала клещевого энцефалита (КЭ) изолированы 18 микстштаммов, содержащих фрагменты генов белков E и NS1 сибирского и дальневосточного, иногда сибирского и европейского подтипов вируса КЭ (ВКЭ). Детекция проведена в ПЦР в реальном времени гибридационно-флюоресцентным методом с гентипспецифическими зондами, методом анализа длин рестрикционных фрагментов и секвенированием E-гена. Микстштаммы изолированы из отдельных клещей *Ixodes persulcatus*, пулов *I. persulcatus* и из крови больных и мозга умерших пациентов. Частота изоляции микстштаммов в зоне симпатрии разных подтипов ВКЭ колеблется от 4,4% (Иркутская область) до 15,1% (Ярославская область). В Забайкальском крае, помимо 2 микстштаммов, изолирован штамм, подобный 886-84-варианту ВКЭ. Подтипы ВКЭ, входящие в состав микстштаммов, находятся в негенетическом взаимодействии – нейтрализме и конкуренции. Микстштаммы стабильны при пассажах в культуре клеток СПЭВ и клонировании. Пассажи через мозг мышей способствуют диссоциации микстштаммов. Обсуждаются условия формирования микстштаммов и их роль в этиологии КЭ.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, генофонд, политиповые штаммы, смешанная инфекция

Контактная информация:

Погодина Ванда Вацлавовна, д-р мед. наук, проф., зав. лаб.; e-mail: pogodina\_v\_v@mail.ru

## Polytypic strains in the genofund of tick-borne encephalitis virus

V. V. Pogodina<sup>1</sup>, L. S. Karan<sup>2</sup>, N. M. Kolyasnikova<sup>1</sup>, S. G. Gerasimov<sup>1</sup>, L. S. Levina<sup>1</sup>, N. G. Bochkova<sup>1</sup>, E. I. Andayev<sup>3</sup>, A. G. Trukhina<sup>3</sup>, T. I. Borisova<sup>3</sup>, E. A. Sidorova<sup>3</sup>, O. A. Nagibina<sup>3</sup>, G. V. Malenko<sup>1</sup>, E. G. Bezrukova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>M. P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalites, Moscow Region; <sup>2</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Russian Inspectorate for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare, Moscow; <sup>3</sup>Irkutsk Antiplague Institute of Siberia and the Far East, Russian Inspectorate for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare

**Eighteen polytypic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains containing the fragments of E and NS1 protein genes of Siberian and Far Eastern, occasionally Siberian and European subtypes were isolated in the European and Asian parts of the tick-borne encephalitis (TBE) area. They were identified using real-time polymerase chain reaction, hybridization-fluorescence detection with genotype-specific probes, restriction fragment length polymorphism analysis, and E protein sequencing. The polytypic strains were isolated from individual Ixodes persulcatus ticks, their pools, from the blood of patients and the brain of dead patients. The isolation rates of the polytypic strains in the sympatry area of different TBEV subtypes ranged from 4.4% (the Irkutsk Region) to 15.1% (the Yaroslavl Region). In addition to 2 polytypic strains, a strain similar to the TBEV 886-84 strain was isolated. The TBEV subtypes entering into the composition of the polytypic strains show nongenetic interactions, such as neutral replication or competition. The polytypic strains are stable during passages in the cultured pig embryo kidney epithelial cells and on cloning. Mouse brain passage promotes dissociation of polytypic strains. The conditions for the formation of polytypic strains and their role in the etiology of TBE are discussed.**

*Key words:* tick-borne encephalitis virus, genofund,

Квазивид вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) включает 3 подтипа (генотипа) – дальневосточный, сибирский и европейский, которые разделяются на пространственно разобщенные кластеры [10, 15].

Штаммы каждого подтипа генетически гетерогенны и варьируют по многим фенотипическим признакам [9, 16, 18]. Появление летальных геморрагических форм КЭ в Новосибирской области связывают с вариантами ВКЭ дальневосточного подтипа, имеющими оригинальные аминокислотные замены [25]. При сравнении последовательностей высоко- и слабовирулентных штаммов того же подтипа выявлены мутации в области генов белков E и NS1, аминокислотные замены в белке NS3, протяженные делеции в 3'-нетранслируемом участке вирусной РНК [4].

В природных популяциях ВКЭ обнаружены своеобразные антигенно-дефектные варианты, лишенные геммагглютинирующей (ГА) и преципитирующей активности [16]. В ходе исследования 4 штаммов сибирского подтипа были выявлены уникальные аминокислотные замены – E67Gly, E122Gly и E277Ala, каждая приводила к увеличению суммарного заряда и гидрофобности на поверхности вириона. При введении индивидуально в инфекционный клон штамма Васильченко каждая замена подавляла ГА-активность и снижала нейровирулентность для мышей [23, 24].

Вологодская популяция сибирского подтипа ВКЭ содержит варианты с устойчивой мутацией в области маркерной аминокислоты в 234-й позиции белка E: тирозин (Y) вместо гистидина (H) или глутамина (Q), что отличает эти варианты от всех известных штаммов сибирского подтипа. Мутация сохраняется в природных популяциях более 30 лет [13, 18].

Помимо разнообразных мутантов, выявлены 2 группы своеобразных политиповых вариантов в природных популяциях ВКЭ. Первая группа первоначально была представлена оригинальными штаммами 886-84 и 178-79, изученными В. И. Злобиным и соавт. [9]. Полно-размерный геном штамма 886-84 расшифрован Л. С. Карань (EF469661, GenBank). Показана мозаичность генетической структуры штамма, чередование аминокислот двух–трех подтипов в пределах одного гена [11, 12]. В настоящее время описаны 10 штаммов, подобных штамму 886-84, которые выделены из клещей *Ixodes persulcatus* и красных полевков [5]. Генетически

сходный штамм выделен из мозга больного, умершего от менингоэнцефалита в Монголии [20].

Другую группу политиповых штаммов составляют так называемые микстштаммы ВКЭ, изолированные из клещей, от больных и умерших пациентов; эти варианты содержат участки геномов двух подтипов одновременно [1, 3, 11, 18].

Обнаружение политиповых штаммов в природных популяциях ВКЭ свидетельствует о том, что разнообразие генофонда ВКЭ определяется не только мутациями, но и взаимодействиями между подтипами ВКЭ, характер которых мало исследован. В настоящей статье изучали свойства и стабильность микстштаммов ВКЭ.

### Материалы и методы

В табл. 1 представлены 18 изученных микстштаммов ВКЭ. Штаммы были изолированы путем 3–4 пассажей в культуре клеток СПЭВ при 37 или 28°C и заражения в мозг молодых (масса тела 5–7 г) или новорожденных белых мышей.

Для генотипирования штаммов применены 3 метода: ОТ-ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флюоресцентной детекцией с генотипспецифическими зондами; анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) с генотипспецифическими рестриктазами *Asu2C1* для дальневосточного, *HinfI* для сибирского и *Bst14C1* для европейского подтипов ВКЭ; секвенирование всего гена белка E или его фрагмента длиной 211 нуклеотидных оснований (н. о.), содержащего маркерную аминокислоту в 206-й позиции. Первый метод характеризует NS1-белок и наиболее чувствителен для выявления микстштаммов ВКЭ. Два других метода позволяют выявить присутствие двух подтипов одновременно, если концентрация РНК одного подтипа не отличается от концентрации другого более чем в 10 раз. Методы детально описаны в работе [11].

Для определения доли политиповых штаммов в вирусной популяции использованы результаты генотипирования набора штаммов и изолятов РНК, выделенных авторами в разных регионах РФ [2, 14, 17, 18].

Для изучения стабильности и свойств штаммов проводили пассажи в культурах клеток СПЭВ и на белых мышках массой 6–7 г. На разных этапах вирус клонировали методом бляшкообразования в культуре клеток

Микстштаммы вируса клещевого энцефалита

Таблица 1

Штамм	Территория и год изоляции	Источник изоляции	Подтипы ВКЭ
Байдар	Казахстан, 1941	Кровь больного, очаговая форма КЭ	Сиб + Дв
I. pers-45	Свердловская обл., 1945	Пул имаго <i>Ixodes persulcatus</i>	Сиб + Дв
Яр-193	Ярославская обл., 1990	1 самка <i>I. persulcatus</i>	Сиб + Дв
Яр-29	Ярославская обл., 1993	1 самка <i>I. persulcatus</i>	Сиб + Дв
Яр-83	Ярославская обл., 1993	1 самка <i>I. persulcatus</i>	Сиб + Дв
Яр-240	Ярославская обл., 1990	Пул имаго <i>I. persulcatus</i>	Сиб + Дв
Яр-12	Ярославская обл., 1992	Кровь больной, стертая форма КЭ	Сиб + Дв
Яр-13	Ярославская обл., 1992	Мозг пациента, очаговая форма КЭ	Сиб + Дв
СК-9/15	Кемеровская обл., 1969	Пул имаго <i>I. persulcatus</i>	Сиб + Дв
СК-13/12	Кемеровская обл., 1969	Пул имаго <i>I. persulcatus</i>	Сиб + Дв
СК-14/41	Кемеровская обл., 1969	Пул имаго <i>I. persulcatus</i>	Сиб + Дв
СК-11/1	Кемеровская обл., 1967	Пул имаго <i>I. persulcatus</i>	Сиб + Дв
Чита-29	Читинская обл., 2002	Мозг пациента, очаговая форма КЭ	Сиб + Дв
44/99	Читинская обл., 1999	Пул имаго <i>I. persulcatus</i>	Сиб + Дв
3319-92	Иркутская обл., 1992	1 клещ <i>I. persulcatus</i>	Сиб + Дв
479	Иркутская обл., 1997	Пул клещей <i>I. persulcatus</i>	Сиб + Дв
3559-18К	Иркутская обл., 1997	1 клещ <i>I. persulcatus</i>	Сиб + Дв
45/69	Иркутская обл., 1969	Кровь больной хроническим КЭ	Сиб + Евр

Примечание. Штаммы Байдар и I. pers-45 изолированы М. П. Чумаковым, кемеровские штаммы – Е. С. Сармановой и Г. Г. Банновой, ярославские штаммы – Н. Г. Бочковой и Л. С. Левиной, штамм 45/69 – Н. Н. Краминской, читинские и иркутские штаммы – Е. И. Андаевым и соавт. Здесь и в табл. 2: Сиб – сибирский подтип, Дв – дальневосточный подтип, Евр – европейский подтип ВКЭ.

СПЭВ под агаровым покрытием. Для молекулярно-генетических исследований готовили элюат бляшки, суспендированный в 1 мл среды 199 на растворе Эрла с 3% телячьей сыворотки, или супернатант культуры СПЭВ после однократного размножения бляшки до появления ЦПД на 4–6-й день.

Вирулентность штаммов определяли, заражая в мозг сирийских хомяков массой 40 г (по 10–12 в группе). Животных наблюдали в течение 1 мес, подсчитывали процент погибших животных и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в днях. Нейроинвазивность оценивали по индексу инвазивности (ИИ) по разнице титров вируса при заражении белых мышей в мозг и под кожу [6, 7]. Опыты на животных выполняли с разрешения этического комитета ИПВЭ им. М. П. Чумакова РАМН [6].

### Результаты

**Детекция микстштаммов.** В процессе генетического анализа многочисленных штаммов, выделенных из клещей *I. persulcatus*, от больных КЭ и умерших пациентов, были выявлены варианты, содержащие участки геномов двух подтипов ВКЭ в области генов белков NS1 и E. В большинстве микстштаммов сочетались генетические структуры сибирского и дальневосточного подтипов, в одном штамме (45/69), изолированном в Иркутской области, присутствовали участки геномов сибирского и европейского подтипов.

Источники изоляции микстштаммов разнообразны: 5 штаммов из отдельных особей *I. persulcatus*, 8 из пулов *I. persulcatus*, 2 из мозга умерших пациентов, 3 из крови больных КЭ. При этом 4 штамма выделены при остром КЭ (очаговая и стертая формы), 1 штамм – при хроническом течении КЭ. Районы изо-

ляции относятся к европейской и азиатской частям нозоареала КЭ: Ярославская, Свердловская, Кемеровская, Иркутская, Читинская области, Казахстан (см. табл. 1). На рис. 1 и 2 показано генотипирование штаммов Яр-83 (выделен из одного клеща) и Яр-240 (изолирован из пула клещей).

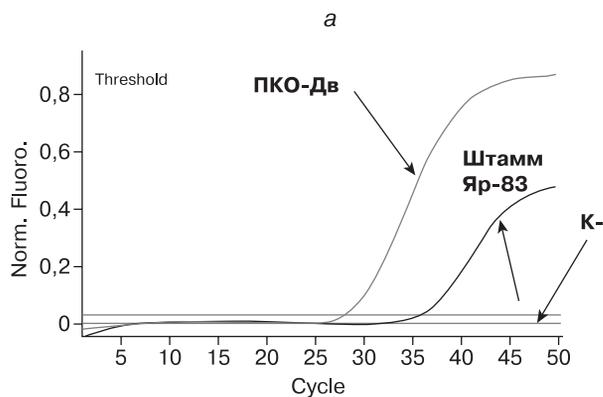
Частоту изоляции микстштаммов ВКЭ определяли в регионах, где нами доказана коциркуляция сибирского и дальневосточного подтипов ВКЭ [2, 14, 17, 18]. В Кемеровской области (1953–1970) выявлены 4 (6%) микстштамма из 67 генотипированных изолятов; к сибирскому подтипу отнесен 61 (91%) штамм, к дальневосточному подтипу – 2 (3%) штамма. В Иркутской области (1995–2005) из 46 выделенных штаммов 3 (6,5%) определены как микстштаммы, 89,1% – как сибирский подтип, 4,4% – как дальневосточный подтип. В Ярославской области (1980–2009) из 33 штаммов 6 (18,2%) явились микстштаммами. Сибирский подтип состав-

лял 75,8%, дальневосточный – 6%. В Забайкальском крае (1995–2010) из 34 генотипированных штаммов 2 (5,9%) определены как микстштаммы, 1 (2,9%) – как 886-84-подобный штамм, 20 (58,8%) отнесены к дальневосточному подтипу, 11 (32,4%) – к сибирскому.

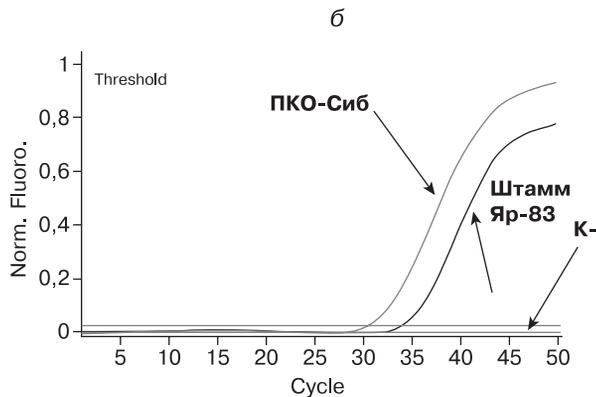
В приведенных расчетах учитывали все микстштаммы, включая изоляты из пулов клещей. Для уточнения полученных данных мы провели учет только тех микстштаммов, которые изолированы из отдельных клещей и от пациентов. В этом случае доля микстштаммов в вирусной популяции составляла 15,1% в Ярославской области и 4,4% в Иркутской области.

**Изучение стабильности и свойств микстштамма Байдар.** Штамм выделен М. П. Чумаковым из крови 16-летнего больного с очаговой формой КЭ. Заболевание началось через 1,5 мес после присасывания клеща. На фоне бессознательного состояния появились левосторонний гемипарез, генерализованные судороги. Из крови, взятой на 5-й день болезни, изолирован вирус. На 9-е сутки больной скончался.

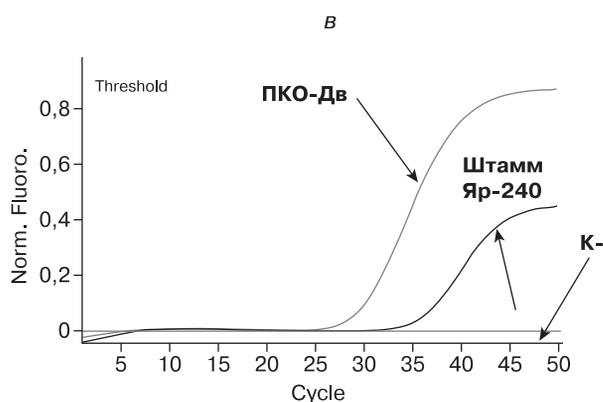
Нами изучен штамм, хранившийся в лиофилизированном состоянии более 60 лет. В исследовании суспензии лиофилизированного штамма в режиме реального времени с генотипспецифическими зондами, а также методом ПДРФ выявлено присутствие в высокой концентрации РНК двух подтипов ВКЭ – сибирского и дальневосточного. Такие же результаты получены при изучении мозга больной мыши в 1-м пассаже. При заражении хомяков 70% животных погибли (типично для дальневосточного подтипа ВКЭ) при удлинённых сроках СПЖ – 19,8 дня (характерно для сибирского подтипа). От 2 незаболевших мышей получили 2 отдельные линии штамма – Байдар-1 и Байдар-2. Во 2-м пассаже на мышках каждая линия



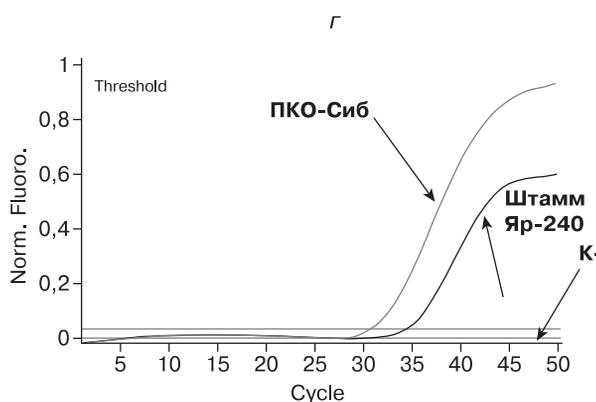
№	Название	Тип материала	Концентрация
15	<b>Яр-83</b>	Проба	<b>35,97</b>
32	<b>К-</b>	Отрицательный контроль	
33	<b>ПКО-Дв</b>	Положительный контроль	<b>28,05</b>
34	<b>ПКО-Сиб</b>	Положительный контроль	



№	Название	Тип материала	Концентрация
15	<b>Яр-83</b>	Проба	<b>34,08</b>
32	<b>К-</b>	Отрицательный контроль	
33	<b>ПКО-Дв</b>	Положительный контроль	
34	<b>ПКО-Сиб</b>	Положительный контроль	<b>30,71</b>



№	Название	Тип материала	Концентрация
1	<b>Яр-240</b>	Проба	<b>35,26</b>
2	<b>К-</b>	Отрицательный контроль	
3	<b>ПКО-Дв</b>	Положительный контроль	<b>28,05</b>
4	<b>ПКО-Сиб</b>	Положительный контроль	



№	Название	Тип материала	Концентрация
15	<b>Яр-240</b>	Проба	<b>34,31</b>
32	<b>К-</b>	Отрицательный контроль	
33	<b>ПКО-Дв</b>	Положительный контроль	
34	<b>ПКО-Сиб</b>	Положительный контроль	<b>30,71</b>

Рис. 1. Результаты детекции штаммов ВКЭ Яр-83 и Яр-240 в ПЦР в режиме реального времени с генотипспецифическими зондами. *а, в* – считывание сигнала по каналу FAM; *б, г* – считывание сигнала по каналу JOE; К – отрицательный контрольный образец; ПКО-Дв – положительный контрольный образец, кДНК ВКЭ дальневосточного генотипа; ПКО-Сиб – положительный контрольный образец, кДНК ВКЭ сибирского генотипа.

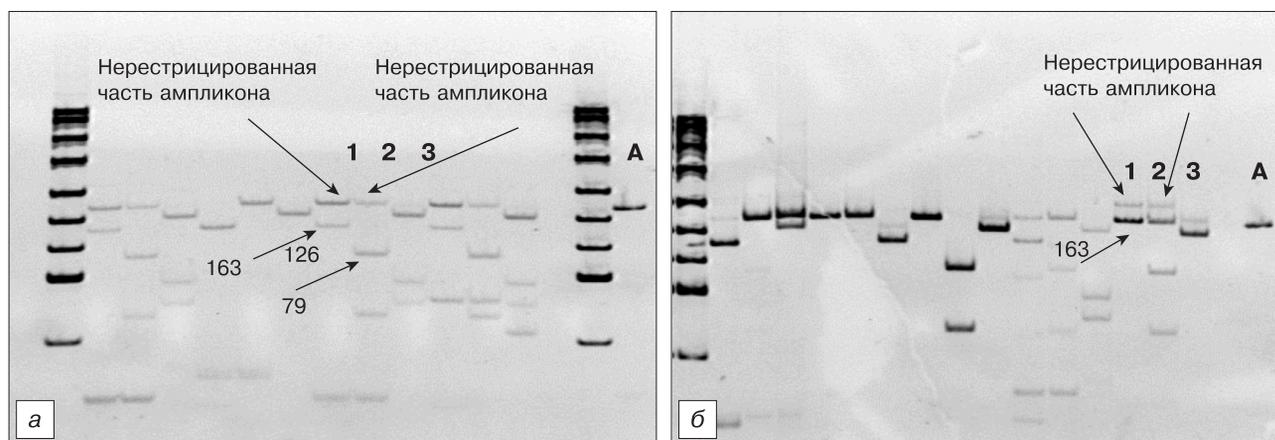


Рис. 2. Результаты детекции штаммов ВКЭ Яр-83 (*а*) и Яр-240 (*б*) методом анализа ПДРФ.

1 – ампликон после рестрикции *Hin*I (для сибирского генотипа рестриционные фрагменты 163 и 42 н. п.); 2 – ампликон после рестрикции *Asu*2CI (для дальневосточного генотипа рестриционные фрагменты 126 и 79 н. п.); 3 – ампликон после рестрикции *Bst*4CI (для европейского генотипа рестриционные фрагменты 160 и 45 н. п.); А – необработанный рестриктазами ампликон.

вызывала гибель животных, в мозге которых выявлены оба подтипа ВКЭ, причем концентрация сибирского подтипа была выше в 10 раз (Байдар-1) или 5 раз (Байдар-2), чем дальневосточного подтипа. На хомьяках обе линии дали промежуточные характеристики между двумя подтипами (гибель 50% животных, СПЖ 19,3 дня).

Удалось секвенировать РНК сибирского подтипа, который входил в состав штамма Байдар. Показано, что этот компонент относится к азиатскому топоварианту сибирского подтипа, входит в кластер штамма Васильченко.

Таким образом, в 4 опытах генотипирования подтверждена политиповая характеристика штамма Байдар. Диссоциация началась на уровне 4–5-го пассажа: возросла вирулентность для хомьяков (100% гибель, СПЖ 7,7–5,8 дня). При генотипировании в вирусной популяции была выявлена только РНК ВКЭ дальневосточного подтипа.

*Изучение стабильности и свойств микстштамма СК-9/15.* Данный штамм определен как политиповой при исследовании лиофилизированного вируса, который ранее прошел 3 пассажа в культуре клеток СПЭВ. Затем штамм прошел 8 пассажей в той же культуре, вызывая ЦПД на 4–5-е сутки, титр  $10^{7,6}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл. На уровне 3, 5, 8-го пассажей проведено клонирование вирусной популяции; размер бляшек варьировал в пределах от 0,95 до 2 мм. Всего типированы 25 проб, включая неклонированную исходную популяцию (2 пробы), 12 клонов 1-го клонирования, 8 клонов 2-го и 3 клона 3-го клонирования. Все пробы, за исключением одной, содержали геномы сибирского и дальневосточного подтипов ВКЭ. Одна из бляшек последнего клонирования (проба № 452) содержала только сибирский подтип ВКЭ ( $10^7$  копий/мл). Концентрация

РНК двух подтипов непосредственно в бляшках (элюаты) была на уровне  $10^5$ – $10^6$ . Один пассаж материала бляшки в культуре СПЭВ повышал концентрацию РНК на 3 порядка и более (табл. 2).

Неклонированный штамм СК-9/15 вызывал гибель 40% сирийских хомьяков при СПЖ 18,2 дня. Клонированный вирус давал гибель 30% животных, СПЖ 24 дня. Приведенные данные ближе к характеристике сибирского подтипа ВКЭ. Исследовали также содержание РНК ВКЭ в селезенке двух хомьяков, заболевших на 8-й день после заражения. В одной селезенке (проба № 501) выявлена РНК двух подтипов ВКЭ в равной концентрации ( $10^6$  копий/мл). В селезенке второго хомьяка присутствовала РНК только сибирского подтипа ( $4,36 \times 10^6$  копий/мл).

Проведенные эксперименты показали высокую устойчивость микстштамма СК-9/15. Только после длительного культивирования в культуре СПЭВ и 3-го клонирования появились признаки элиминации из смешанной популяции дальневосточного подтипа ВКЭ. Сходные результаты получены при заражении сирийских хомьяков. Штамм СК-9/15 после 5 пассажей в культуре СПЭВ и 1 пассажа на мышах содержал только сибирский подтип ВКЭ.

*Изучение стабильности и свойств микстштамма Яр-13.* Штамм изолирован из мозга умершей больной С., 58 лет. Заболела на 5-е сутки после присасывания клеща. Умерла на 7-е сутки от начала заболевания. Диагностирована тяжелая полирадикулоневритическая форма КЭ и сопутствующие заболевания – гипертоническая болезнь, острое нарушение мозгового кровообращения по ишемическому типу, иксодовый клещевой боррелиоз (?). Выделенный штамм пассировали в культуре клеток СПЭВ и на мышах, идентифицировали как ВКЭ в реакциях нейтрализации, диффузионной преципитации и реакции торможения гемагглютинации (Н. Г. Бочкова). На уровне 9-го культурального пассажа штамм исследовали методом ПЦР в режиме реального времени с генотип-специфическими зондами и методом анализа ПДРФ, в результате выявлены генетические структуры сибирского и дальневосточного подтипов. Штамм обладал невысокой нейроинвазивностью (ИИ 2,9) и слабой вирулентностью для сирийских хомьяков (гибель 20%, СПЖ 28 дней, что может указывать на преобладание в популяции сибирского подтипа ВКЭ). После 5 дополнительных пассажей через мозг мышей выявлена диссоциация штамма. Вирусную популяцию трижды клонировали в клетках СПЭВ, отбирая из конечных разведений ( $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ) крупные и мелкие бляшки. Всего генотипировали 62 клон: 36 клонов 1-го клонирования, 14 и 12 клонов 2-го и 3-го клонирования. Все клоны генотипированы как дальневосточный подтип ВКЭ, что свидетельствует об элиминации из вирусной популяции сибирского подтипа. Клонированный вирус резко усилил вирулентность для хомьяков – гибель 100% животных, СПЖ 9,4 дня.

*Микстштамм Чита-29.* Штамм выделен от умершего больного 28 лет. Через 21 день после укуса клеща развилась менингоэнцефалическая форма КЭ с летальным исходом на 8-е сутки. Штамм высокопатогенен для белых мышей (титр  $10^9$  ЛД<sub>50</sub>/мл), высокоинвазивен (ИИ 0,36). При заражении сирийских хомьяков выявлено совпадение характеристик дальневосточного (гибель 75% животных) и сибирского подтипов

Таблица 2  
Генотипирование клонов штамма СК-9/15

Этап клонирования*	№ пробы	Результат генотипирования	Концентрация РНК, копий/мл	
			Дв-подтип	Сиб-подтип
Популяция штамма СК-9/15 КЖ, СПЭВ, ЦПД+	57	Два подтипа	$4,12 \times 10^{10}$	$2,78 \times 10^9$
	58	" "	$2,78 \times 10^{10}$	$1,65 \times 10^9$
I. Элюат клонов	59	" "	$6,62 \times 10^5$	$1,51 \times 10^5$
	60	" "	$2,67 \times 10^7$	$3,34 \times 10^6$
I. Клоны, размноженные в культуре СПЭВ, слив, ЦПД+	69	" "	$1,01 \times 10^{11}$	$8,12 \times 10^9$
	73	" "	$6,77 \times 10^{10}$	$5,54 \times 10^9$
II. Элюат клонов	231	" "	$2,03 \times 10^6$	$2,70 \times 10^5$
	234	" "	$7,67 \times 10^6$	$2,21 \times 10^6$
II. Клоны, размноженные в культуре СПЭВ, слив, ЦПД+	254	" "	$6,99 \times 10^{10}$	$4,78 \times 10^9$
	256	" "	$4,53 \times 10^{10}$	$2,53 \times 10^9$
III. Элюат клонов	449	" "	$6,85 \times 10^7$	$9,84 \times 10^6$
	452	Сиб подтип	0	$4,70 \times 10^2$
Клон, размноженный в культуре СПЭВ, слив	453	Два подтипа	$4,11 \times 10^{10}$	$1,78 \times 10^9$

Примечание. \* – элюат клонов (материал бляшки) суспендирован в питательной среде.

ВКЭ (СПЖ 18,8 дня). Штамм обладал выраженной ГА-активностью (титр 1:640).

По результатам анализа ПДРФ и ПЦР с генотипспецифическими зондами штамм охарактеризован как микстштамм, содержащий фрагменты дальневосточного и сибирского подтипов в области генов белков E и NS1. При секвенировании фрагментов гена NS1 длиной 140 н. о. также выявлен генетический материал сибирского и дальневосточного подтипов. В дальневосточном компоненте этого штамма в области связывания зонда имелись замены. В 3053-й и 3062-й позициях находился тирозин, что объединяет штамм Чита-29 с выделенным на той же территории штаммом Чита-18.

После 3 пассажей на сосунках белых мышей и 2 пассажей на мышках массой 6–7 г клонировали вирусную популяцию. Секвенирование РНК, изолированной из неклонированной вирусной суспензии и крупной бляшки, выявило последовательности только дальневосточного подтипа.

### Обсуждение

Впервые политиповые варианты ВКЭ обнаружены при иммунотипировании штаммов в реакции диффузионной преципитации в агаре (РДПА) с перекрестно адсорбированными сыворотками к трем серотипам ВКЭ. Из 81 штамма, изолированного в 1979–1986 гг. в Прибайкалье, 3 были политиповыми – 568-84, 886-84, 898-84 [19]. Один политиповой штамм выявлен среди курганских штаммов [17].

Проведенные нами исследования с использованием современных молекулярно-генетических методов показали, что политиповые штаммы составляют существенный компонент вирусных популяций. Частота их обнаружения в зонах симпатрии разных подтипов ВКЭ составляет 4,4–15%.

Т. В. Демина и соавт. [8] с помощью панели из 40 зондов, адресованных ко всем 10 генам ВКЭ, обнаружили среди 273 штаммов 5 политиповых: 3 штамма содержали последовательности трех основных генотипов ВКЭ и 2 штамма имели РНК дальневосточного и сибирского подтипов. Среди остальных 268 штаммов при генотипировании по 160 н. о. гена E выявлены 10 (3,7%) штаммов, принадлежащих к группе 886-84-подобных изолятов [8].

Описанные нами микстштаммы содержали фрагменты геномов сибирского и дальневосточного подтипов ВКЭ. Лишь в одном иркутском штамме – 45/69 найдены участки геномов сибирского и европейского подтипов (см. табл. 1). Это согласуется с данными о коциркуляции 3 подтипов ВКЭ на данной территории [5, 8].

Каждый микстштамм имеет свою историю.

Приведем возможные варианты их формирования:

– микстштамм выделен из одного клеща: смешанная инфекция в клеще могла возникнуть при кормлении на животном, несущем коинфекцию, или повторном инфицировании разными подтипами по ходу метаморфоза;

– микстштамм выделен из пула клещей: пул включает отдельных клещей с двойной инфекцией или клещей, дискретно зараженных разными подтипами. В этом случае микстштамм представляет смесь, образовавшуюся в лабораторных условиях при изоляции штамма;

– микстштамм выделен от больного или умершего человека: укус одного клеща, несущего двойную

инфекцию, или заражение двумя подтипами при множественных одновременных или последовательных укусах клещей.

Первый и последний варианты отражают формирование микстштаммов в естественных условиях.

Стабильность микстштаммов ВКЭ зависит от системы размножения. В культуре клеток СПЭВ штамм СК-9/15 длительно сохранял политиповой характер и только после 3 клонирований появились признаки диссоциации и элиминации дальневосточного подтипа. Штамм Байдар около 50 дней существовал в организме человека (период инкубации и болезни), прошел не менее 5 пассажей на мышках и был в 4 отдельных опытах генотипирован как микстштамм. Чередующиеся пассажи на мышках и в культуре, серийные пассажи на мышках приводят к разделению микстштаммов с элиминацией сибирского подтипа ВКЭ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 2 подтипа ВКЭ, входящие в состав микстштаммов, могут длительное время сосуществовать в одном хозяине, не влияя друг на друга. Позднее развивается конкуренция с исключением из популяции одного из подтипов. Такой тип негенетических взаимодействий наблюдается и при моделировании смешанной инфекции в организме белых мышей и сирийских хомяков [6, 7]. При остром течении смешанной инфекции селективные преимущества имеет дальневосточный подтип, при латентной смешанной инфекции селективными преимуществами обладает сибирский подтип ВКЭ [7]. Термин “микстштамм” отражает сущность изученных нами политиповых штаммов, выделенных из клещей и от больных людей, – смесь двух генотипов.

Роль микстштаммов в этиологии КЭ требует анализа с позиций патогенеза инфекции. Изоляция штамма Байдар из крови больного на 5-й день инфекции указывает на то, что 2 подтипа прошли висцеральную фазу инфекции с размножением в органах системы иммунитета, в печени и др. Это привело к выраженной вирусемии, однако неясно, оба ли подтипа ВКЭ смогли преодолеть гематоэнцефалический барьер, инфицировать ЦНС и стать причиной летального исхода заболевания. Выделение микстштаммов из ткани мозга умерших больных (Яр-13, Чита-29) доказывает роль сибирского и дальневосточного подтипов в этиологии очаговой летальной формы КЭ.

В последние годы меняются представления о числе подтипов ВКЭ. G. Grard и соавт. [22] выделяют 4 генотипа – западного, восточного, турецкого КЭ овец, шотландского энцефаломиелита овец. При этом сибирский подтип включается в состав восточного КЭ. Последнее кажется малообоснованным. Авторы сравнивали по одному прототипному штамму сибирского и дальневосточного подтипов [22] без учета их генетической гетерогенности [4, 10, 12, 13, 18, 21, 26].

В. Б. Локтев [15] сохраняет разделение на 3 подтипа: дальневосточный, сибирский и европейский, включая в последний возбудителей турецкого, испанского и шотландского энцефалита овец.

В. И. Злобин и соавт., М. М. Верхозина и соавт. [5, 9] рассматривают штамм 886-84 и родственные ему изоляты как возможный 5-й генотип ВКЭ, 4-й генотип связывают со штаммом 178-79. Это новый подход к таксономии ВКЭ. В качестве самостоятельных подтипов предложены штаммы, в геноме которых че-

редуются нуклеотиды, характерные для 3 уже известных подтипов [11, 12].

Описанные нами микстштаммы ВКЭ и штаммы 5-го генотипа различаются по механизму образования. В основе микстштаммов лежат негенетические взаимодействия 2 подтипов ВКЭ, тогда как появление 5-го генотипа связано, вероятно, с генетическими взаимодействиями – последовательными множественными рекомбинациями между геномами основных подтипов ВКЭ [9]. Однако при этом отсутствуют индивидуальные последовательности, отличные от других генотипов ВКЭ.

Различаются ареалы: микстштаммы выделены в европейской и азиатской частях нозоареала КЭ; 4-й и 5-й генотипы распространены только в Восточной Сибири, где они суммарно составляют 6,6% популяции ВКЭ [9].

Общей чертой микстштаммов и 886-84-подобных вариантов является способность вызывать очаговые летальные формы КЭ.

Исследование поддержано грантом Президента Российской Федерации МК-1380.2010.7.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андаев Е. И., Трухина А. Г., Карань Л. С. и др. Клещевой энцефалит в Читинской области и этиология очаговых форм с летальным исходом // Бюл. СО РАМН. – 2007. – № 4 (126). – С. 60–65.
2. Андаев Е. И., Борисова Т. И., Трухина А. Г. и др. Структура популяции вируса клещевого энцефалита в Забайкальском крае // Молекулярная диагностика-2010. – М., 2010. – Т. 2. – С. 206–208.
3. Безрукова Е. Г. Роль сибирского подтипа вируса клещевого энцефалита в этиологии острых и хронических форм заболевания (сопоставление с дальневосточным подтипом): Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2009.
4. Беликов С. И., Леонова Г. Н., Кондратов И. Г. и др. Анализ полногеномных последовательностей штаммов дальневосточного субтипа вируса клещевого энцефалита, обладающих различной нейровирулентностью для человека // Бюл. СО РАМН. – 2007. – № 4 (126). – С. 22–28.
5. Верхозина М. М., Козлова И. В., Дорощенко Е. К. и др. Биологические свойства и генетическая структура оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных на территории Предбайкалья и Забайкалья // Журн. инфекц. патол. (Иркутск). – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 83–84.
6. Герасимов С. Г., Погодина В. В., Колясникова Н. М. и др. Взаимодействие сибирского и дальневосточного подтипов вируса клещевого энцефалита при микстинфекции в организме млекопитающих. I. Факторы, влияющие на тип взаимодействия // Вопр. вирусол. – 2011. – № 2. – С. 19–22.
7. Герасимов С. Г., Погодина В. В., Колясникова Н. М. и др. Взаимодействие сибирского и дальневосточного подтипов вируса клещевого энцефалита при микстинфекции в организме млекопитающих. II. Конкуренция подтипов при острой и латентной инфекции // Вопр. вирусол. – 2011. – № 3. – С. 41–44.
8. Демина Т. В., Джиоев Ю. П., Верхозина М. М. и др. Мультифокусное зондирование генома вируса клещевого энцефалита // Журн. инфекц. патол. (Иркутск). – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 98–99.
9. Злобин В. И., Демина Т. В., Верхозина М. М. и др. Антигенные и генетические типы вируса клещевого энцефалита // Вестн. Уральск. мед. акад. – 2010. – Вып. 21. – С. 85–89.
10. Карань Л. С., Погодина В. В., Фролова Т. В., Платонов А. Е. Генетические различия восточноевропейской и азиатской популяций вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа // Бюл. сиб. мед. – 2006. – № 5, прил. 1. – С. 24–27.
11. 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.
12. Карань Л. С., Маленко Г. В., Бочкова Н. Г. и др. Применение молекулярно-генетических методов для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита // Бюл. СО РАМН. – 2007. – № 4 (126). – С. 34–40.
13. Колясникова Н. М., Карань Л. С., Лесникова М. В. и др. Своеобразие штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных в Вологодской области на протяжении 30-летнего периода // Современные научные и прикладные аспекты клещевого энцефалита. – М., 2007. – С. 64–65.
14. Колясникова Н. М. Мониторинг структуры популяций вируса клещевого энцефалита в Уральском, Западно-Сибирском и Северо-западном регионах России (вирусологические и молекулярно-биологические исследования): Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2008.
15. Локтев В. Б. Вирус клещевого энцефалита. Генетические особенности и его изменчивость в современном мире // Бюл. СО РАМН. – 2007. – № 4 (126). – С. 14–21.
16. Погодина В. В., Бочкова Н. Г., Джиоганян Т. И. и др. Явление антигенной дефектности у циркулирующих в природе штаммов вируса клещевого энцефалита и его возможная связь с серонегативными формами заболевания // Вопр. вирусол. – 1992. – № 2. – С. 103–107.
17. Погодина В. В., Бочкова Н. Г., Карань Л. С. и др. Сибирский и дальневосточный подтипы вируса клещевого энцефалита в европейских и азиатских регионах России: генетическая и антигенная характеристика штаммов // Вопр. вирусол. – 2004. – № 4. – С. 20–25.
18. Погодина В. В., Карань Л. С., Колясникова Н. М. и др. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя // Вопр. вирусол. – 2007. – № 5. – С. 16–21.
19. Трухина А. Г. Особенности популяции возбудителя клещевого энцефалита в зоне распространения двух серотипов вируса на территории Прибайкалья: Дис. ... канд. мед. наук. – Иркутск, 1989.
20. Хаснатинов М. А., Данчинова Г. А., Кулакова Н. В. и др. Генетическая характеристика возбудителя клещевого энцефалита в Монголии // Вопр. вирусол. – 2010. – № 3. – С. 27–32.
21. Demina T. V., Dzhiyev Y. P., Verkhosina M. M. et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes // J. Med. Virol. – 2010. – Vol. 86, N 6. – P. 965–976.
22. Grard G., Moureau G., Charrel R. H. et al. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insight into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy // Virology. – 2007. – Vol. 361, N 1. – P. 80–92.
23. Khasnatinov M., Ustanikova K., Frolova T. V. et al. The molecular determinants of haemagglutinating-deficiency of natural isolates of tick-borne encephalitis virus // IX International congress of virology. – Istanbul, 2008. – P. 257.
24. Khasnatinov M., Ustanikova K., Frolova T. V. et al. Non-haemagglutinating flaviviruses: molecular mechanisms of the emergence of new strains via adaptation to European ticks // <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone0007295>.
25. Ternovoy V. A., Kurzhukov G. P., Sokolov Y. V. et al. Tick-borne encephalitis virus with haemorrhagic syndrome, Novosibirsk Region, Russia, 1999 // Emerg. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 9. – P. 743–746.
26. Sidorova E., Andaev E., Borisova T. et al. Molecular-genetic heterogeneity of tick-borne encephalitis virus in Transbaikalian Region // 21-st ECCMID/27-th ICC: Milan, 2011.

Поступила 03.11.11