

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»  
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

ПОНОМАРЕВА ЕВГЕНИЯ ПАВЛОВНА  
**ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В РЕГИОНАЛЬНЫХ ПРИРОДНЫХ  
ОЧАГАХ И ЕГО ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРИ АДАПТАЦИИ  
К НОВОМУ ХОЗЯИНУ**

1.5.10 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
к.б.н. Терновой В.А.

Кольцово – 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИИ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	6
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	
1.1 Общая характеристика флавивирусов. Таксономическое положение .....	12
1.2 Морфологические признаки ВКЭ .....	17
1.3 Функции структурных белков ВКЭ .....	20
1.4 Функции неструктурных белков ВКЭ .....	23
1.5 5' и 3'-нетранслируемые области вирусной РНК ВКЭ .....	26
1.6 Цикл репродукции флавивирусов .....	32
1.7 Дивергенция и эволюция ВКЭ .....	36
1.8 Генетическое разнообразие вируса КЭ, изменение структуры вирусной популяции .....	38
1.9 Хозяин-специфические генетические детерминанты флавивирусов .....	46
1.10 Молекулярные основы вирулентности флавивирусов .....	52
1.11 Популяция вируса и смена хозяев .....	58
1.12 Заключение .....	62
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	
2.1 Химические реактивы, ферменты и наборы .....	64
2.2 Вирусы, используемые в работе .....	64
2.3 Культуры клеток .....	66
2.4 Животные .....	67
2.5 Выделение и титрование ВКЭ .....	67
2.6 Иммуноферментный анализ .....	68
2.7 Выделение РНК и синтез кДНК (обратная транскрипция) .....	68
2.8 Полимеразная цепная реакция .....	69
2.9 Электрофорез и выделение продукта ПЦР из агарозы .....	71
2.10 Определение нуклеотидной последовательности (по методу Сэнгера)....	71
2.11 Определение нуклеотидной последовательности (по методу NGS) .....	72
2.12 Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей .....	72

2.13 Филогенетический анализ .....	74
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	
3.1 Изучение генетической вариабельности 5'-нетранслируемой области генома вируса клещевого энцефалита в различных регионах Северной Евразии .....	75
3.2 Выделение и характеристика высокопатогенного штамма С11-13 вируса клещевого энцефалита .....	86
3.3 Генетическая изменчивость ВКЭ при адаптации вируса от культур клеток к мелким млекопитающим .....	95
3.4 Генетическая изменчивость 3'-НТО геномной РНК ВКЭ при адаптации к различным типам клеток .....	100
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	111
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	115
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	117
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b> .....	152

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.к. – аминокислота(ы);

а.о. – аминокислотный остаток;

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита;

КВЭ – клещевой вирусный энцефалит;

КЭ – клещевой энцефалит;

н. – нуклеотиды;

НТО/НТР (untranslated regions, UTR) – нетранслируемая область/регион;

ОРТ – открытая рамка трансляции;

ОТ – обратная транскрипция;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

СПЭВ (SPEV, РЕК) – перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи;

ЦНС – центральная нервная система;

ЦПД – цитопатическое действие;

ЭПР – эндоплазматический ретикулум;

СТНД – C-terminal hydrophobic domain;

CS (conserved sequences) – консервативная последовательность НТО;

DB (dumbbell element) – элемент гантели НТО;

DR (direct repeats) – прямой повтор НТО;

DENV – вирус лихорадки Денги;

НЕК 293 (293) (англ. Human Embryonic Kidney 293) – культура клеток эмбриональных почек человека;

LRSs (long repeat sequences) – длинные повторяющиеся последовательности;

LSH (long stable hairpin) – длинная стабильная шпилька;

MBFV – флавивирусы переносимые комарами;

NCFV – неклассифицируемые флавивирусы;

Neuro-2a – культура клеток нейробластомы мыши;

NKV – флавивирусы с неизвестным вектором передачи;

POL – домен РНК-зависимой РНК полимеразы;

PK (pseudoknot) – псевдоузел (псевдокнот), элемент вторичной структуры;

S<sup>Pro</sup> – домен сериновой (химотрипсин-подобной) протеиназы;

SL – стеблевая петля НТО;

TBFV – флавивирусы переносимые клещами;

WNV – вирус Западного Нила;

YFV – вирус желтой лихорадки;

ZIKV – вирус Зика.

## ВВЕДЕНИЕ

Ежегодно в мире регистрируется более 10 000 случаев заболевания людей клещевым энцефалитом (КЭ). За последние десятилетия существенно выросло количество заболевших, а также географически увеличилась и продолжает расти зона поражения этим заболеванием (Морозько и Галустян, 2021; Утенкова и Савиных, 2021; Randolph, 2010).

КЭ распространен на достаточно обширной территории и охватывает всю лесостепную зону Евразийского континента от японского острова Хоккайдо на востоке до островов Великобритании на западе (Злобин, 2010; Утенкова, Савиных, 2021).

В настоящее время все изоляты вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) делятся на три основных субтипа/генотипа – дальневосточные, сибирские и европейские (западные), которые названы в соответствии с их преобладающим географическим распространением на Евразийском континенте (Simmonds et al., 2012). Эти субтипы характеризуются разнообразной векторной специфичностью, диапазоном хозяев и клиническими проявлениями. Генетический анализ показал, что дальневосточные и сибирские являются филогенетически ближе друг к другу, чем к европейскому (Grard et al., 2007; Simmonds et al., 2012).

КЭ является трансмиссивным заболеванием. Хотя вирус и был выделен из 16 видов твердых клещей, все же основными переносчиками являются два вида иксодовых клещей – *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus* (Pukhovskaya et al., 2018). *I. ricinus* играет роль основного вектора для европейского генотипа, тогда как ВКЭ дальневосточного и сибирского генотипа передается преимущественно *I. persulcatus* (Gritsun et al., 2003c; Hayasaka et al., 2001). Помимо этих двух видов клещей, переносчиками вируса могут быть и другие виды иксодовых клещей, такие как *Haemaphysalis concinna*, *Haemaphysalis japonica*, *Dermacentor silvarum*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor marginatus* и др. (Злобин, 2010). В естественной окружающей среде основными хозяевами КЭ являются мелкие лесные млекопитающие. Эти животные могут действовать как резервуары для вируса, без развития клинических симптомов КЭ, а люди являются лишь

случайными хозяевами (Bogovic, Strle, 2015). Человеческие инфекции КЭ связаны с рядом клинических проявлений: от простой лихорадки, до тяжелого энцефалита с/или без миелита (Gritsun et al., 2003b). Было отмечено, что клиническое течение и исход КЭ обычно связаны с генотипом ВКЭ, вызвавшего инфекцию (Gritsun et al., 2003b; Mansfield et al., 2009). Заражение дальневосточным генотипом обычно вызывает более тяжелое течение заболевания, с летальностью 20 – 40% и более, с высокой вероятностью тяжелых неврологических осложнений. В отличие от тяжелых последствий заражения дальневосточным генотипом, заболевание, вызываемое европейским протекает в основном без осложнений и часто имеет двухфазное течение, а уровень смертности составляет от 0,5 до 2% (Burke, Monath, 2001). Сибирский генотип может индуцировать хроническую прогрессирующую форму КЭ и смертность с показателем ниже 6-8% (Gritsun et al., 2003b).

Хотя во многих ранних исследованиях представлена обширная информация о специфичности вектора ВКЭ, диапазоне хозяев и клинических проявлениях, причина генетического разнообразия остается, до некоторой степени, невыясненной (Bakhvalova et al., 2016; Kunze, 2016).

Эпидемические и патогенетические особенности возбудителя могут быть отражением результата его адаптации при распространении в новые экологические ниши. Обнаруживая генетические изменения ВКЭ при адаптации к новому хозяину, мы делаем важный шаг в картировании и понимании роли тех генетических детерминант, которые участвуют в эпидемических и патогенетических различиях.

Большой интерес представляет изучение варибельности нетранслируемых областей (НТО) у природных вариантов ВКЭ. В опубликованных данных содержатся указания на то, что варибельность 5'- и 3'-НТО флавивирусов может обуславливать адаптацию вируса к различным хозяевам (Gritsun, Gould, 2006 a-c; Gritsun, Gould, 2007a-b; Khromykh et al., 2003). Однако, информация о хозяин-специфических детерминантах в геноме ВКЭ крайне ограничена. Чтобы разобраться в молекулярных факторах, лежащих в основе процессов адаптации

вируса клещевого энцефалита к различным хозяевам, мы выполнили детальный анализ генома нового, высокопатогенного штамма С11-13, в сравнении с известными штаммами и природными вариантами ВКЭ при смене хозяина.

**Цель исследования:**

Целью данной работы являлось сравнение генетического разнообразия вируса клещевого энцефалита в отдаленных друг от друга природных очагах, а также выделение и характеристика генома штамма С11-13 вируса клещевого энцефалита, оценка его скорости и диапазона изменчивости при смене хозяина.

**Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:**

1. Исследовать структурное разнообразие нетранслируемой области геномной РНК у природных вариантов вируса клещевого энцефалита из очагов КЭ Западной Сибири, Дальневосточном регионе России и приграничной к России Восточной Европе.

2. Провести генетическую характеристику изолята С11-13 вируса клещевого энцефалита, вызвавшего особо тяжелую быстротекущую форму заболевания энцефалитом у человека, оценить скорость и диапазон изменчивости геномной РНК вируса клещевого энцефалита штамма С11-13 в результате пассажей на различных культурах клеток и картировать аминокислотные замены, которые, возможно, определяют эффективность его адаптации к новому хозяину.

3. Определить ключевые генетические детерминанты вариантов вируса клещевого энцефалита штамма С11-13 при адаптации к новому хозяину (культура клеток → мелкие млекопитающие).

4. Изучить генетическую изменчивость 3'-НТО геномной РНК вируса клещевого энцефалита при смене хозяина в модельном эксперименте на культурах клеток и животных.

**Научная новизна:**

1. Впервые в регионе Юго-Восточной Европы, на территории Республики Молдова, у клещей *Ixodes ricinus*, *Dermacentor spp.* и *Haemaphysalis spp.*,

собранных с домашних животных и в сельскохозяйственных угодьях, обнаружен вирус клещевого энцефалита дальневосточного генотипа.

2. Получены новые данные по структурному разнообразию НТО природных вариантов ВКЭ в иксодовых клещах в некоторых природных очагах Западной Сибири, Дальневосточном регионе России и приграничной к России Восточной Европе.

3. Картированы наиболее значимые аминокислотные замены в вирусных белках ВКЭ С11-13 при смене хозяина.

4. Проведена оценка скорости изменчивости структурных и не структурных белков изолята С11-13 ВКЭ, при пассировании на различных культурах клеток.

5. Получены новые данные по изменчивости генетических детерминант вариантов ВКЭ в модельном эксперименте по адаптации вируса (после пассажей на различных культурах клеток) к новому хозяину – мелким млекопитающим.

#### **Научно-практическая значимость работы:**

Получены новые данные о распространенности ВКЭ в природных очагах Западной Сибири, Дальневосточном регионе России и приграничной к России Восточной Европе. Эти данные представляют практическую ценность для развития и совершенствования дифференциальной диагностики, с учетом территориальных различий, переносимых клещами инфекций у лиц, пострадавших от укусов клещей.

В динамике получена фенотипическая и генетическая характеристика штамма С11-13 ВКЭ. Было показано, что при проведении более 2 – 3 пассажей на различных культурах клеток и на мышах, лабораторные штаммы ВКЭ приобрели генетические изменения. Полученные лабораторные штаммы существенно отличались от исходных природных изолятов ВКЭ, поскольку приобрели селективное преимущество при размножении на культурах клеток и на мышах. Данное обстоятельство необходимо учитывать при трактовке экспериментальных данных полученных на лабораторных штаммах ВКЭ и получении вакцинных штаммов.

Получены данные о том, что гетерогенность популяции ВКЭ, а также изменения соотношения различных вариантов в ней, не могут обеспечить достаточные селективные преимущества при репродукции ВКЭ в новом хозяине. В формировании вариантов ВКЭ имеющих селективное преимущество над природными изолятами, при смене хозяина, участвуют процессы отражающие, в себе сложные взаимоотношения клетки и вируса.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. В восьми районах Республики Молдова у клещей *Ixodes ricinus*, *Dermacentor spp.* и *Haemaphysalis spp.*, собранных с домашних животных и в сельскохозяйственных угодьях, выявлен вирус клещевого энцефалита дальневосточного генотипа.

2. У природных изолятов ВКЭ обнаружены нуклеотидные замены, которые могут вызывать изменение вторичной структуры РНК 5'-НТО ВКЭ и иметь принципиальное значение для адаптации вируса в природных очагах к новым видам переносчиков и хозяев. Вариабельность 5'-НТО отражает особенности строения генома ВКЭ, обеспечивая эффективную репликацию вируса в клетках птиц, млекопитающих и клещей.

3. У вируса клещевого энцефалита (С11-13), выделенного из клеток мозга человека после смертельной инфекции, при смене хозяина в модельном эксперименте (человек → культура клеток → мелкие млекопитающие) произошли замены в геноме, которые привели к мутациям в структурных и не структурных белках ВКЭ.

4. У вируса клещевого энцефалита выделенного от человека, при пассировании на различных культурах клеток (клетки почки эмбриона свиньи (SPEV), нормальные клетки эмбриональных почек человека (НЕК 293) и нейронов мышцы (Neuro-2a)) и мелких млекопитающих, обнаружено изменение длины нуклеотидной последовательности в вариабельной части 3'-НТО.

**Вклад автора:**

Автором были выполнены все запланированные виды вирусологических и молекулярно-биологических исследований, включая работу с животными и культурами клеток. Автором лично проводились работы по выделению вирусной РНК, постановке обратной транскрипции и ПЦР, определению нуклеотидных последовательностей вирусных геномов, обобщению полученных результатов и их анализу с использованием прикладных компьютерных программ. Результаты выполненной работы были опубликованы в рецензируемых журналах, материалы были представлены на Российских и международных конференциях.

### **Благодарности:**

Автор выражает благодарность своим коллегам: к.б.н. Микрюковой Т.П., к.б.н. Тупота Н.Л., к.ф.-м.н. Швалову А.Н. за обучение методам молекулярной диагностики, участие в проведении экспериментов, а также за терпение, понимание и всестороннюю поддержку. Отдельную благодарность автор выражает к.б.н. Протопоповой Е.В. за помощь в части культивирования ВКЭ.

Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю, заведующему лабораторией молекулярной эпидемиологии ООИ, к.б.н. Терновому В.А. за помощь в выборе темы, направления исследований и всестороннюю поддержку и заведующему отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов, профессору, д.б.н. Локтеву В.Б. за помощь в обсуждении полученных результатов и в публикации научных работ.

Автор искренне признателен всем коллегам за ценные критические замечания по тексту этой работы и без участия которых выполнение настоящей работы было бы невозможно.

### **Структура и объем диссертации:**

Диссертация представлена на 155 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, четырех глав собственных результатов и обсуждения полученных результатов с выводами и списком литературы. Список использованной литературы включает 54 отечественных и 211 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 17 рисунками, содержит 11 таблиц и 1 приложение.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Общая характеристика флавивирусов. Таксономическое положение

В 1900 году, расследуя причину вспышки желтой лихорадки среди контингента американских войск на Кубе, военные врачи У. Рид и Д. Кэрролл обнаружили вирус, способный вызывать заболевание у людей. В своих экспериментах они доказали, что вирус (желтая лихорадка) передается людям через переносчиков – комаров (первый установленный арбовирус – англ. **AR**thropod – **BO**rne viruses – означает, что вирус передается через укус членистоногих) (Strode, 1951).

Вирус желтой лихорадки стал прототипным представителем большого семейства Flaviviridae, который дал название семейству и роду флавивирусов. Термин "*flavi*" происходит от латинского слова "*flavus*" – желтый и ассоциируется с желтым цветом кожи у больных желтой лихорадкой (Львов, 2000).

Согласно современной классификации вирусов, семейство флавивирусов (Flaviviridae) делится на четыре рода: флавивирусы (*Flavivirus*), пестивирусы (*Pestivirus*), пегивирусы (*Pegivirus*) и гепацивирусы (*Hepacivirus*), которые включают 89 различных типов вирусов [<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>]. Также стоит отметить и неклассифицированные вирусы, связанные с семейством Flaviviridae.

Род *Flavivirus* является наиболее многочисленным и в настоящее время насчитывает 15 антигенных комплексов. Большинство вирусов, вызывающих энцефалит, относятся либо к антигенному комплексу японского энцефалита, либо к антигенному комплексу клещевого энцефалита. Представители этого рода принадлежат к большой экологической группе арбовирусов и включают более 50 вирусных видов, объединяющих 75 различных флавивирусов.

Род *Hepacivirus* включает в себя один вид – *Hepacivirus C* или вирус гепатита С. Возбудитель характеризуется высокой генетической изменчивостью.

Роды *Pegivirus* и *Pestivirus* не содержат представителей, патогенных для человека. В то же время, заражение вирусом GBV – С (вид *Pegivirus A*) широко распространено среди людей (до 10 – 15% от общей численности населения).

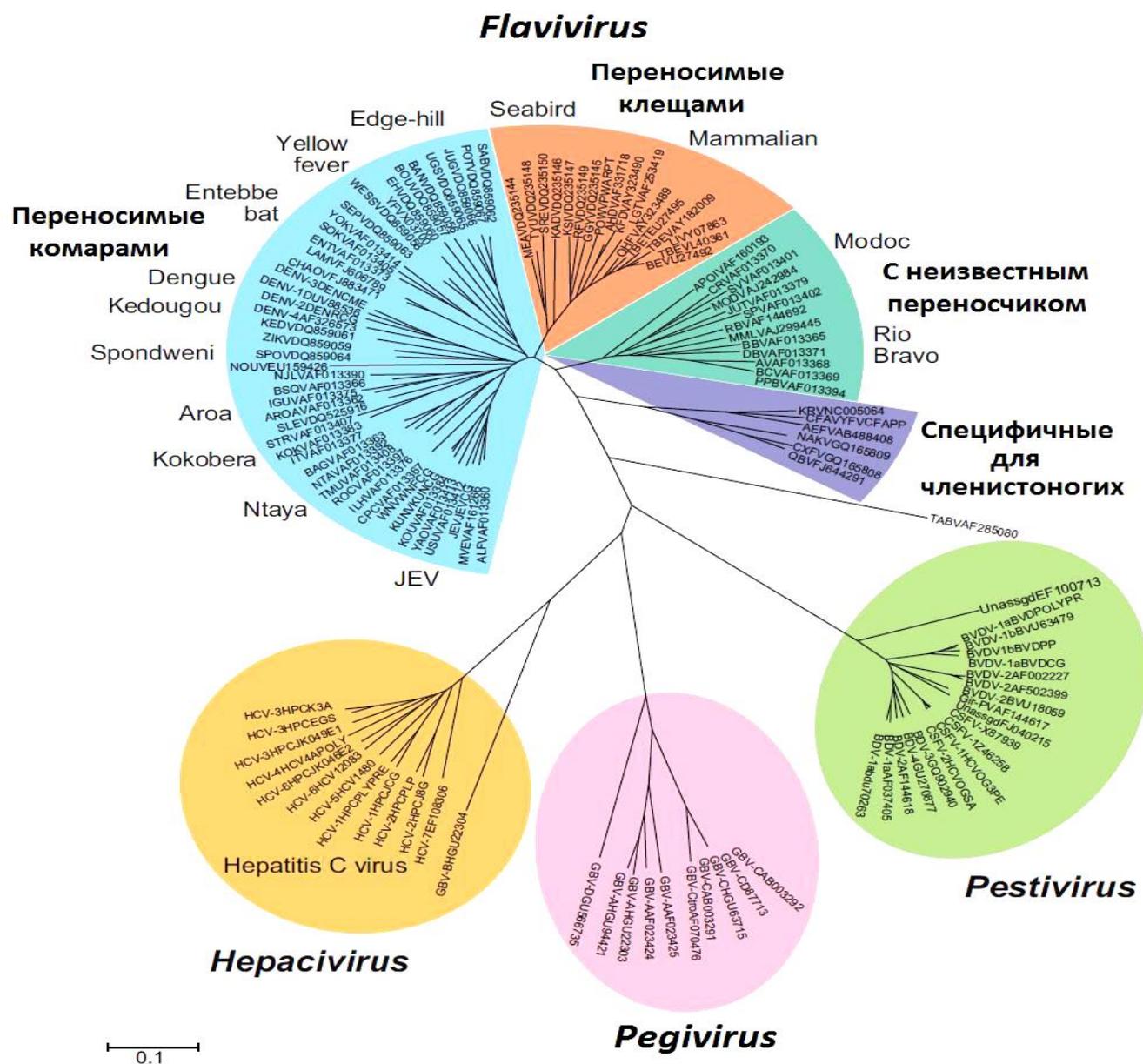
Первоначально предполагалось, что этот вирус вызывает один из вариантов вирусного гепатита (гепатит G) у человека. Однако, связь вируса GBV – C с каким-либо заболеванием человека не установлена (Thiel et al., 2005).

Неклассифицированные флавивирусы (*flavi lake*) – достаточно многочисленная группа вирусов и включает 51 вирусных вида. К ним относятся вирусы передающиеся:

- через укус клеща (1) – Karshi virus(DQ235147);
- через укус комара (3) – Fitzroy River virus (KM361634); Spondweni virus (DQ859064); Т'Но virus (EU879061);
- специфичные для насекомых (21) – Aedes flavivirus (AB488408); Cell fusing agent virus (M91671); Kamiti River virus (AY149905); Mosquito flavivirus (KC464457) и др.;
- вирусы с неизвестным вектором среди членистоногих (15) – Barkedji virus(KC496020); Tina virus(KY320649); Haseki tick virus (MN256635-MN256642) и др.;
- многокомпонентные (сегментированные) флавивирусоподобные вирусы (11). Особый интерес вызывает открытие новых сегментированных (многокомпонентных) флавивирусоподобных вирусов в различных видах клещей – Jingmen tick virus (KJ001579, KJ001580, KJ001581, KJ001582); Mogiana tick virus (JX390986, KY523073, JX390985, KY523074); Alongshan virus (MH158415, MH158416, MH158417, MH158418); Kindia tick virus (MH678723, MH678724, MH678725, MH678726,); Manuch virus (MN218697, MN218698 и др.).

Флавивирусы способны заражать широкий спектр организмов, включая млекопитающих, насекомых, птиц и рептилий (Grard et al., 2007). Все флавивирусы делятся на три группы (рисунок 1.1): вирусы переносимые комарами (MBFV), переносимые клещами (TBFV) и флавивирусы с неизвестным вектором передачи (NKV) (Heinz et al., 2000). Неклассифицированные флавивирусы также имеют сходную организацию генома и одинаковые векторы передачи. Это позволило условно разделить флавивирусы на инфекции,

переносимые клещами и комарами, а также на группу вирусов, переносчик которых неизвестен (Burke, 2001).



**Рисунок 1.1** Филогенетические отношения в семействе Flaviviridae, основанные на анализе консервативной последовательности РНК-зависимой РНК-полимеразы (NS5 или NS5B) (Knipe, Howley, 2013).

Многие флавивирусы могут вызывать опасные заболевания у людей. Такие патогены, как вирус клещевого энцефалита, вирус японского энцефалита, вирус желтой лихорадки, вирус лихорадки Денге, вирус лихорадки Западного Нила и вирус Зика, представляют серьезную эпидемическую угрозу для людей (Monath,

Heinz, 1995). Для России наиболее значимым является вирус клещевого энцефалита, впервые обнаруженный в 1937 году на Дальнем Востоке группой ученых под руководством профессора Льва Александровича Зильбера (Воспоминания..., 2001).

ВКЭ является прототипным представителем одноименной вирусной серогруппы. В этот серокомплекс входят вирусы клещевого энцефалита, Омской геморрагической лихорадки, Лангата, Повассана, лесной болезни Киасанур, энцефаломиелита шотландских овец.

Клещевой энцефалит – это природно-очаговая нейровирусная инфекция, которая распространяется по всей лесной и лесостепной зоне Евразийского континента и за его пределами, от японского острова Хоккайдо на востоке и до островов Великобритании на западе (Злобин, 2010; Утенкова, Савиных, 2021).

В Российской Федерации заболевание широко распространено, высокоэндемичными районами являются Уральский, Сибирский и Дальневосточный регионы (Приморский край) (рисунок 1.2).

Самая высокая распространенность инфекции установлена на Южном и Среднем Урале, а также на юге Западной Сибири (Курчаков, Цкарозия, 2021; Морозько, Галустян, 2021). На Дальнем Востоке клещевой энцефалит протекает в более тяжелой форме с частыми летальными исходами, а на юге Восточной Сибири наряду с высокой распространенностью инфекции характерна ее частая хронизация. Сезонное заболевание весенне-летнего энцефалита повсеместно распространяется носителями вируса в природе – иксодовыми клещами (Тикунова и др., 2019). В европейской части основным переносчиком вируса является лесной клещ *I. ricinus*, а в азиатской части ареала – таежно-луговой клещ *I. persulcatus* и клещ Павловского *Ixodes pavlovskyi* (Коренберг и др., 2002; Rar et al., 2017; Rar et al., 2019). Клещ *I. pavlovskyi* был впервые обнаружен на Дальнем Востоке России в середине прошлого века. Ареал состоит из двух разъединенных частей – восточной и западной, расположенных на Дальнем Востоке и в Западной Сибири. По морфологии, генетическим признакам и активности схож с таежным клещом. Служит переносчиком тех же самых инфекционных агентов, что и

таежный, хотя их встречаемость в этих двух видах клещей существенно различается (Rar et al., 2017).

## Клещевой энцефалит в России



**Рисунок 1.2** Перечень административных территорий субъектов Российской Федерации, эндемичных по клещевому энцефалиту в 2021 году. Роспотребнадзор.

В некоторых очагах ВКЭ переносят клещи *Haemaphysalis concinna*, *Dermacentor silvarum*, *Dermacentor pictus* и др. Считается, что в природе переносчиками вируса являются до 16 видов клещей, но их эпидемическая роль невелика. Также КЭ возможно заразиться и при употреблении молока от инфицированных животных. (Аммосов, 2006).

Врожденная инфицированность клещей поддерживает постоянный уровень вирусофорности этих насекомых. Дополнительным естественным резервуаром вируса являются прокормители клещей – многочисленные грызуны (полевая мышь, бурундук, заяц, еж и др.), а также другие дикие и домашние животные. В природе вирус поддерживается постоянной циркуляцией по замкнутому кругу: клещи – прокормители – клещи. Заражение ВКЭ человека – является

биологически тупиковым направлением, поскольку вирус, как правило, не передается другому организму и выходит из естественной циркуляции (Леонова и др., 1996).

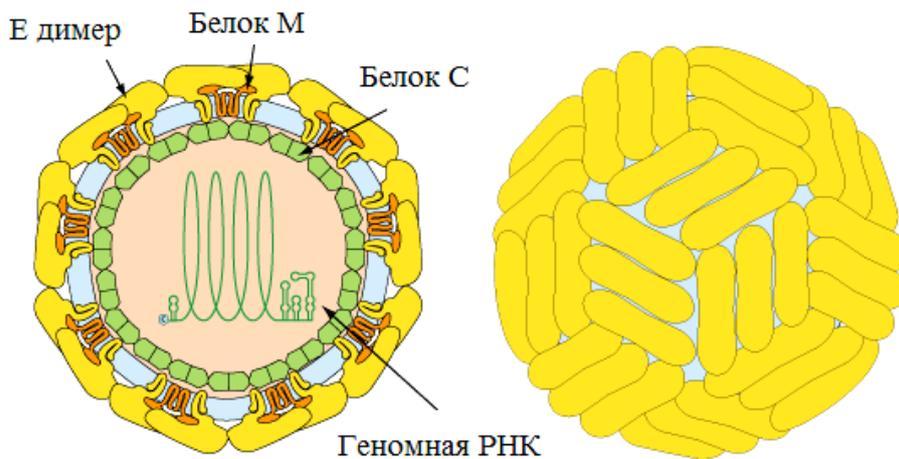
Клещевой вирусный энцефалит (КВЭ) поражает центральную нервную систему. Последствия этого заболевания непредсказуемы – от полного выздоровления до нарушений здоровья, приводящие к инвалидности и смерти. На территории Российской Федерации в течение эпидемического сезона 2021 года зарегистрировано более 430 тысяч случаев обращений после укусов клещей (в 2020 году – более 460 тысяч случаев), из них на долю детей до 17 лет приходится 107 тысяч (24,8%). За последние десять лет количество обращений по поводу укусов клещей остается относительно постоянным и составляет в среднем 340 тысяч случаев в год. Заболеваемость КВЭ в январе-сентябре 2021 г. находилась на уровне заболеваемости аналогичного периода 2020 г. Было зарегистрировано 938 случаев КВЭ, показатель заболеваемости составил 0,64 на 100 тыс. населения. В 2021 году было зарегистрировано 14 случаев смерти от КВЭ. Большинство пострадавших не были вакцинированы против КВЭ, в 6 случаях имело место несвоевременное обращение за медицинской помощью [<https://www.rospotrebnadzor.ru>].

Инкубационный период заболевания составляет от 7 до 28 дней. В европейской части России заболевание КЭ протекает, как правило, в виде сильной лихорадки, которая может иметь двухфазный характер. В азиатской части страны часто встречаются менингеальные, менингоэнцефалитические и очаговые формы заболевания КЭ. При тяжелых формах заболевания развиваются параличи и парезы, главным образом верхнего плечевого пояса и дыхательных мышц. Известны случаи хронических форм клещевого энцефалита у людей. Выздоровление происходит медленно, у большинства из тех, кто был болен, наблюдаются стойкие остаточные явления менингоэнцефалита (Gritsun et al., 2003).

## **1.2 Морфологические признаки ВКЭ**

Флавивirusы представляют собой небольшие, размером около 45 – 50 нм, сферической формы РНК-содержащие несегментированные вирусы с липидной оболочкой. Вирусные частицы состоят из нуклеокапсида, сформированного вирусным капсидным белком, вирусной РНК и липидного бислоя. Форма нуклеокапсида – двадцатигранник с кубическим типом симметрии.

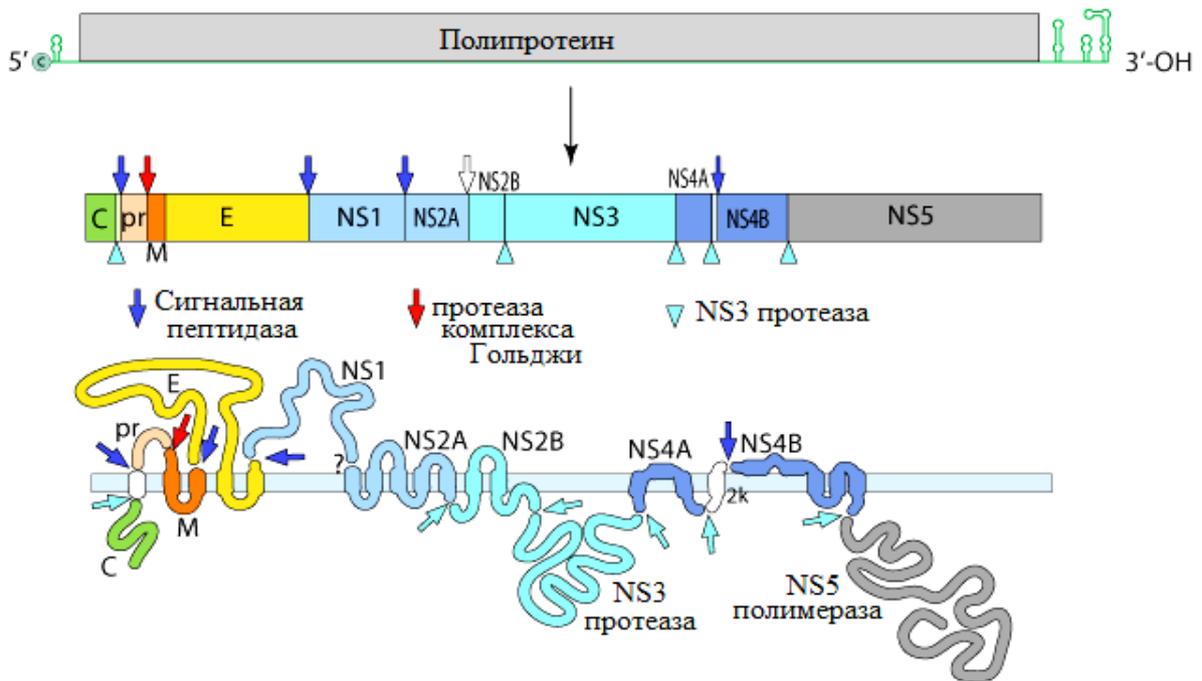
В состав нуклеокапсида входят три структурных белка – белок С и два поверхностных белка М (мембранный) и Е (оболочечный), погруженных в мембрану вириона и вместе с липидами образующие оболочку вируса (рисунок 1.3). Снаружи нуклеокапсид покрыт суперкапсидом, который состоит из липидной мембраны и встроенных в нее гликопротеиновых шипов длиной около 10 нм, образованных Е-белком, обладающим гемагглютинирующими свойствами (Heinz, Mandl, 1993; Rice, 1996).



**Рисунок 1.3** Схема строения вируса клещевого энцефалита. Заимствовано с сайта [ViralZone [www.expasy.ch/viralzone](http://www.expasy.ch/viralzone) – Швейцарский институт биоинформатики]

Геном представлен положительной одноцепочечной РНК, состоящей из приблизительно 11000 нуклеотидов (около 3414 а.о.), кодирующих одну открытую рамку трансляции (ОРТ). ОРТ кодирует полипротеин, который разрезается на индивидуальные структурные и неструктурные белки; последние обеспечивают репликацию вирусного генома и протеолитическое расщепление

полипротеина. Геном ВКЭ кодирует 10 вирусных белков и 3 коротких вирусных полипептида (рисунок 1.4).



**Рисунок 1.4** Геном вируса клещевого энцефалита. Заимствовано с сайта [ViralZone [www.expasy.ch/viralzone](http://www.expasy.ch/viralzone) – Швейцарский институт биоинформатики]

Семь неструктурных белков NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5 обеспечивают репликацию вирусного генома в клетке. NS2A, NS2B, NS4A и NS4B это низкомолекулярные, гидрофобные белки, чьи функции в развитии вируса в клетках пока ясны не до конца, но предполагается, что они могут взаимодействовать с другими вирусными белками и РНК. NS5 это РНК-зависимая РНК-полимераза. Структурные и неструктурные белки последовательно считываются в единой рамке трансляции и необходимы для размножения вируса в клетках хозяина. Все они образуются в результате процессинга вирусного полипротеина. Полипротеин подвергается ко- и пост- трансляционному процессингу клеточными и вирусными протеазами на индивидуальные белки (Zanotto et al., 1996). Геномная РНК инфекционна и в клетке функционирует как мРНК (Gritsun et al., 2003).

В таблице 1.1 представлены паттерны протеолитического расщепления вирусными протеазами у ВКЭ (ТБЕВ) и у некоторых других флавивирусов, переносимыми комарами.

**Таблица 1.1. Предполагаемые сайты расщепления протеазами у ТБЕВ (ТБФВ), RBV (NKV), и YFV (МБФВ) (Charlier et al., 2002).**

Участок расщепления (протеаза)*	Расщепления после аминокислоты, номер	RBV†	YFV‡	TBEV‡
VirC↓CTHD	90	KKQRR↓GGTES	SRKRR↓SHDVL	RGKRR↓SATDW
AnchC↓prM	107	TGLMA↓MQVSQ	LMTGG↓VTLVR	GMTLA↓ATVRK
Pr↓M	194	HRLKR↓SLSIT	RRSRR↓AIDL P	SRTRR↓SVLIP
M↓E	269	APSYS↓TQCVN	GPAYS↓AHCIG	APVYA↓SRCTH
E↓NS1	753	TGVMG↓DHGCA	LGVGA↓DQGCA	LGVGA↓DVGCA
NS1↓NS2A	1107	GLVYA↓GSMTA	SWVTA↓GEIHA	SMVVA↓DNGEL
NS2A↓NS2B	1330	HRGQR↓ATDYT	IFGRR↓SIPVN	HRGRR↓SFSEP
NS2B↓NS3	1463	DATQR↓SIIVF	RGARR↓SGDVL	RSSRR↓SDLVF
NS3↓NS4A	2079	AQMRR↓SGVLL	AEGRR↓GAAEV	ASGRR↓SFGDV
NS4A↓2K	2200	EGMQR↓TQIDS	PGQQR↓SIQDN	AGKQR↓SSDDN
2K↓NS4B	2223	VTVVA↓NEMRL	SAVAA↓NELGM	GLVAA↓NEMGF
NS4B↓NS5	2477	RSDRR↓GIVTS	KTGRR↓GSANG	SGGRR↓GGSEG

**Примечание:** RBV – Rio Bravo virus, YFV – Yellow fever virus, TBEV – tick-borne virus.

\* VirC, зрелый белок С вириона; CTHD, С-концевой гидрофобный домен; ANCHC, закрепленный белок С (зрелый белок С CTHD).

† Данные по RBV взяты из Billoir et al. (2000).

‡ Данные для YFV и TBEV, взятые из Chambers et al. (1990).

### 1.3 Функции структурных белков ВКЭ

**Белок С** имеет молекулярную массу около 11 кДа (92 а.о.). Его основная роль заключается в образовании комплекса с вирусной РНК и образовании нуклеокапсида вириона. С и N-концы белка содержат большое количество основных остатков, и эти области специфически связываются с вирусной РНК (Khromykh, Westaway, 1997). Центральный домен белка С содержит гидрофобный домен, который, скорее всего, взаимодействует с клеточными мембранами и играет важную роль в сборке вириона (Markoff et al., 1997).

Незрелая форма белка С содержит СТНД (C-terminal hydrophobic domain, С-концевой гидрофобный домен), полипептид, состоящий из 20 а.о., который отщепляется сериновой протеазой с образованием короткого полипептида СТНД.

Полипептид СТНД довольно вариабелен. Так, например, штамм Глубинное/2004 (DQ862460) содержит 5 аминокислотных замен по сравнению с другим дальневосточным штаммом 205(JX498939) ВКЭ и 8 замен со штаммом Sofjin(JX498940). Модификация сайтов протеолиза в этой области, возможно, может определять скорость созревания вирусных частиц в инфицированных клетках. Таким образом, штамм Глубинное/2004(DQ862460) с модифицированным полипептидом СТНД способен образовывать более чем в 250 раз больше инфекционных вирионов на ранних стадиях репликации ВКЭ (Чаусов и др., 2010).

**Белок ргМ/М** является предшественником белка М, который имеет молекулярную массу около 8 кДа (75 а.о.), участвует в образовании созревающих вирусных частиц, связанных с клеточной стенкой. Незрелые вирусные частицы содержат белок ргМ и белок Е в форме гетеродимера и не являются инфекционными. Белок ргМ является частью вириона и разрезается во время созревания фуриноподобной протеазой на фрагмент Pr, который секретируется из клетки, и белок М, который остается в вирионе (Lindenbach, 2007).

**Структурный белок М** расположен на С-конце полипептида ргМ и является частью зрелой вирусной частицы. Он имеет относительно короткий эктодомен (41 а.о.), предположительно существующий в альфаспиральной конфигурации и трансмембранный якорь. Антитела к району 31 – 41 а.о. белка М способны

нейтрализовать вирусную инфекционность, что указывает на важную роль белка М в проникновении вируса в клетки и возможности использования белка М для формирования противовирусного иммунитета (Богачек и др., 2007).

**Белок Е** имеет молекулярную массу около 50 кДа (496 а.о.) и является основным структурным мембранным белком ВКЭ, который отвечает за сборку вириона, слияние мембран и связывание с рецептором. В случае нейтрального значения рН гликопротеин Е представляет собой димер, мономеры которого состоят из трех отдельных доменов. Считается, что мутации, влияющие на патогенность вируса, связаны с изменениями в кодирующей последовательности этих трех доменов белка Е (Grard et al., 2007; Mandl, 2001).

Белок Е образует гомодимеры, располагающиеся параллельно липидной оболочке на внешней поверхности вирусных частиц (Rey et al., 1995). Рентгеноструктурная модель белка Е включает эктодомен, образованный 1 – 395 аминокислотными остатками, который состоит из трех доменов и двух трансмембранных сегментов. Наиболее известные генетические маркеры этого белка включают следующие аминокислотные мотивы:

– высококонсервативный пептид слияния для флавивирусов

DRGWGNHCGXFGKG (белок Е – положение 98 - 111 а.о.), который обеспечивает слияние вирусных и клеточных мембран (Allison et al., 2001);

– двенадцать остатков цистеина в позициях 3, 30, 60, 74, 92, 105, 116, 121, 186, 290, 307 и 338 белка Е, которые образуют внутримолекулярные дисульфидные связи и которые консервативны для всех ВКЭ (Nowak, Wengler, 1987);

– три потенциальных N-X-T/S сайта гликозилирования в положениях 154-156, 361-363 и 473-475 (Chambers et al., 1990);

– рецепторная область между 53-86 а.о., обеспечивающая взаимодействие с ламинин-связывающим белком клетки, который является клеточным рецептором/корцептором для ВКЭ, а также ВЗН (Богачек и др., 2005).

Нуклеотидная последовательность, соответствующая N-концу белка Е, довольно изменчива и поэтому часто используется для генотипирования изолятов ВКЭ, а также для проведения генетической диагностики клещевого энцефалита.

#### 1.4 Функции неструктурных белков ВКЭ

**Белок NS1** – является гликопротеином и обладает иммуногенными свойствами, имеет молекулярную массу около 46 – 55 кДа (353 а.о.) и, существующий в нескольких изоформах и олигомерных состояниях. Единственный неструктурный гликопротеин NS1 флавивирусов, который находится на поверхности инфицированных клеток и секретируется из инфицированных клеток в форме гомо- и гетеродимеров. Белок NS1 выполняет несколько функций, связанных с репликативным циклом и патогенезом. Известно, что внутриклеточный димер NS1 регулирует вирусную транскрипцию посредством взаимодействия с другими вирусными неструктурными белками NS4A и NS4B (Hilgenfeld, 2016). Он содержит 12 высококонсервативных остатков цистеина, 3 потенциальных сайта гликозилирования, которые формируют внутримолекулярные связи. NS1 способен формировать стабильный гомодимер, при секреции из клеток дает растворимую гексамерную форму (Hall et al., 1999). Гомодимер имеет выраженный гидрофобный характер и связан с различными мембранами клетки. Хотя NS1 связан с мембранами, он не содержит канонических трансмембранных районов и достаточно легко освобождается от мембран при щелочной pH или при обработке мочевиной. Гомодимер NS1 способен секретироваться инфицированными клетками млекопитающих, образуя при этом растворимую гексамерную форму NS1 (Flamand et al., 1999). Известно, что мутации в NS1 влияют на вирулентность флавивирусов и как правило, значительно снижают уровень репликации вирусной РНК, что позволяет предполагать важную роль этого белка в этом процессе. NS1 также воздействует на ранние процессы репликации. В инфицированной клетке этот белок обнаруживается в комплексе NS1-NS2A, которая за счет гидрофобности цепи NS2A приобретает способность удерживаться на клеточных мембранах. Растворимые формы белка NS1 известны в качестве комплемент-связывающего антигена. Этот антиген присутствует в инфицированных клетках и тканях зараженных животных и способен вызывать выраженный протективный эффект при иммунизации животных (Lin et al., 1998).

**NS2A** небольшой гидрофобный трансмембранный белок, имеет молекулярную массу около 22 кДа (229 а.о.). Белок участвует в нескольких процессах: репликации вируса, сборке вирионов, гибели клетки-хозяина. Для некоторых флавивирусов была показана способность NS2A прочно связываться с 3'-концом геномной РНК и вступать в специфические взаимодействия с белками NS3 ( $S^{\text{Pro}}$ -HEL) и NS5 (POL). (Mackenzie et al., 1998). Это позволяет предположить участие этого белка в работе мембрансвязанного репликативного комплекса. Кроме того, NS2A способен индуцировать изменения клеточных мембран и способствовать сборке вирусных частиц на поздних стадиях инфекции.

**NS2B** является кофактором вирусной протеиназы NS3, имеет молекулярную массу около 14 кДа (131 а.о.) и существует в виде мембрансвязанного белка. Он имеет два выраженных гидрофобных домена, который окружают один консервативный гидрофильный домен (Arias et al., 1993). В комплексе с NS3 он необходим для проявления активности сериновой протеазы NS3. Фрагмент из 40 аминокислот в консервативном домене NS2B необходим для проявления протеазной активности комплекса NS2A-NS3.

**NS3** белок имеет молекулярную массу около 70 кДа (621 а.о.). Неструктурный вирусный белок NS3 содержит на N-конце домен химотрипсин-подобной сериновой протеиназы. Протеиназа  $S^{\text{Pro}}$  в составе NS3 осуществляет, при содействии кофактора NS2B, котрансляционное и посттрансляционное разрезание полипротеина по всем сайтам, кроме сайтов, фланкирующих белок E, которые процессируются сигнальными пептидазами клетки.

Активный центр вирусной геликазы NS3 ассоциируется с каноническим мотивом DEXH (Asp-Glu-Ala-(Asp/His)) и расположен на C-конце белка (Gorbalenya et al., 1989). Расплетание двухцепочечной вирусной РНК требует энергии, которую обеспечивает расщепление клеточных трифосфатов NS3. N-конец NS3 гомологичен сериновым протеазам, что обеспечивает NS3 в комплексе с NS2B свойства сериновой протеазы (Gorbalenya et al., 1989).

На C-конце NS3 находятся домены НТРазы ((рибо)нуклеозидтрифосфатаза)/РНК хеликазы и РНК-гамма-фосфатазы

(RTPазы). RTPаза является компонентом кепирующей системы флавивируса, осуществляющим отщепление гаммафосфата от 5'-конца (+)РНК. NS3 взаимодействует с РНК полимеразой NS5 и участвует в репликации (Аграновский, 2019).

Точный механизм функционирования NS3 не известен, однако клетки млекопитающих содержат DEXH – подобную РНК геликазу, экспрессия которой существенно возрастает при репликации ВКЭ (Монастырская и др., 2004).

**NS4A** белок имеет молекулярную массу около 16 кДа (126 а.о.) и является гидрофобным белком связанным с клеточными мембранами (Mackenzie et al., 1998). Он располагается в клетке в месте репликации вирусной РНК и способен образовывать комплекс с NS1. Это позволяет считать, что он вовлекается в работу репликативного комплекса и обеспечивает его прикрепление к клеточным мембранам.

**NS4B** белок имеет молекулярную массу около 27 кДа (252 а.о.) и также является гидрофобным белком. Он локализуется аналогично NS4A и дополнительно обнаруживается в ядре клетки (Westaway et al., 1997). По всей вероятности, он также вовлекается в процесс репликации вирусной РНК. NS4B подвергается посттрансляционной модификации с образованием короткого полипептида 2К. Механизм данной модификации и ее биологический смысл не известны. NS4A и NS4B выполняют (вместе с NS1) функции ремоделирования мембран. Кроме того, эти белки, входя в состав репликативных комплексов, регулируют функции других неструктурных белков. Например, NS4A и NS4B являются аллостерическими кофакторами NS3, которые влияют на протеиназную, РНК-связывающую и РНК-хеликазную активности этого белка. В частности, было обнаружено, что NS4A снижает потребность NS3 хеликазы в АТФ, а NS4B способствует расплетанию цепей РНК (Аграновский, 2019).

**NS5** это самый большой и наиболее консервативный вирусный белок флавивирусов с молекулярной массой около 103 кДа (903 а.о.). Данный белок имеет ферментативные активности РНК-зависимой-РНК-полимеразы, метилтрансферазы и гуанилтрансферазы, таким образом, выполняя важнейшие

функции в вирусной репликации. Он имеет выраженную гомологию с РНК полимеразы других РНК позитивных вирусов. Помимо полимеразной активности отмечена метилтрансферазная активность этого белка (Koonin, 1993). Эти ферментные активности делают NS5 ключевым ферментом в репликации флавивирусов, который является перспективной мишенью для поиска новых противовирусных препаратов, направленно блокирующих активные центры NS5 и репликацию вируса.

**Короткие полипептиды ВКЭ** – при разрезании вирусного полипротеина образуются три коротких полипептида: СТНД (20 а.о.), Pr (89 а.о.) и 2К (23 а.о.) (Gritsun et al., 2003a-b; Grard, 2006). Полипептиды СТНД и Pr являются лидерными последовательностями для структурных белков С и М, соответственно. Они определяют, по всей вероятности, транспортировку полипептидов внутри клетки, правильность сборки и созревания вириона. Полипептид 2К расположен между NS4А и NS4В в последовательности полипротеина. Его аминокислотный состав практически одинаков у большинства известных последовательностей ОРС вирусов комплекса клещевого энцефалита. Только вирусы Алькхурма и Киасанурской лесной болезни имеет множественные аминокислотные замены в полипептиде 2К. Функция полипептида не известна (Roehrig, 2003).

### **1.5 5' и 3'- нетранслируемые области вирусной РНК ВКЭ**

Геномная РНК фланкирована 5' и 3'-НТО, которые принципиально важны для инициации вирусной репликации (Proutski et al., 1999). Её 5'-нетранслируемая область кэпирована по первому типу (m7GpppAmpN2), начинается с консервативного динуклеотида AG и содержит около 130 нуклеотидов; 3'-НТО неполиаденирована и содержит 430-760 нуклеотидов, заканчивается консервативным динуклеотидом CU.

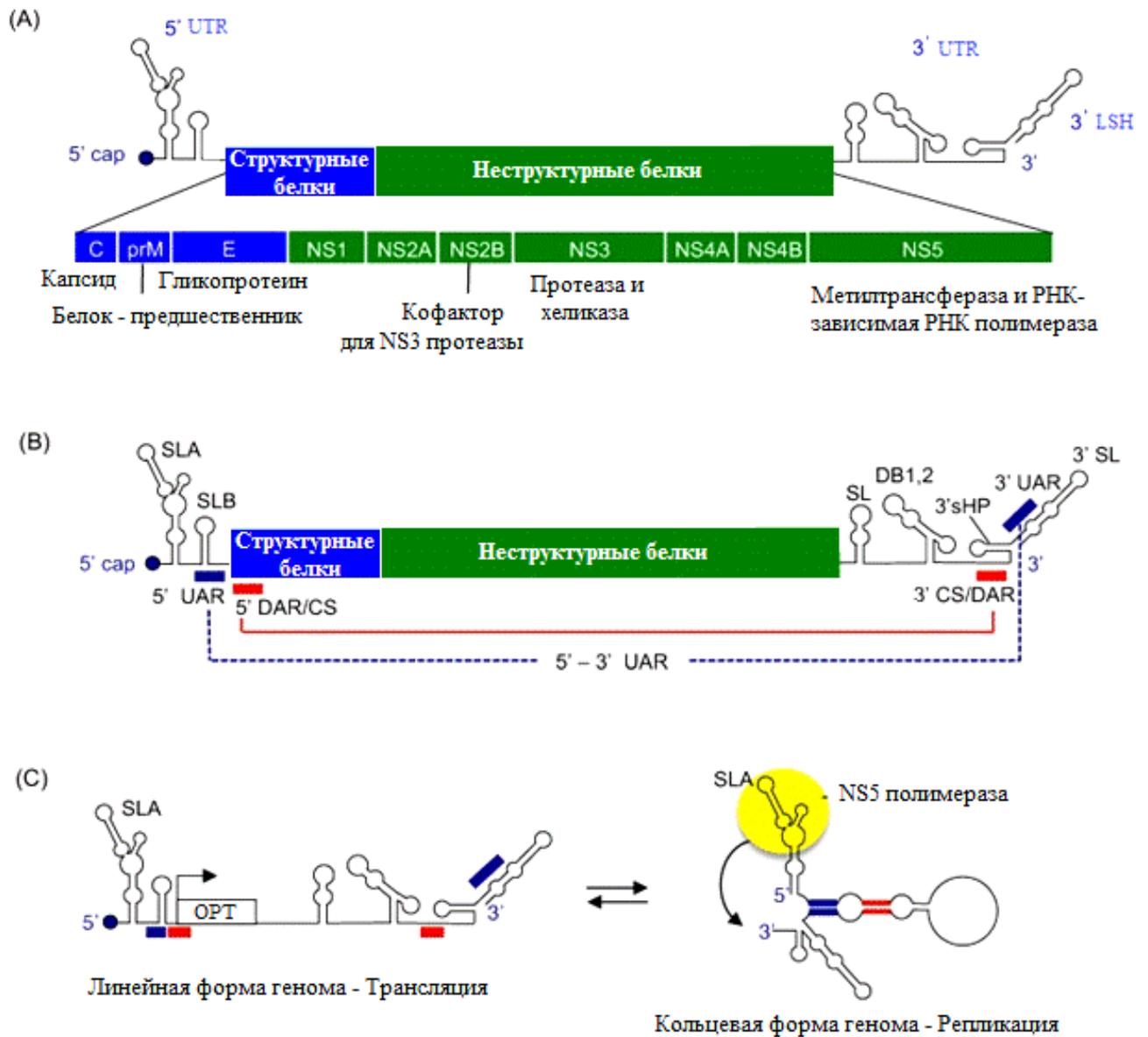
В 5' и 3' – некодирующих концевых последовательностях вирусной РНК, обрамляющих рамку считывания, содержатся регуляторные элементы РНК, которые участвуют в формировании вторичной структуры РНК и контролируют

многочисленные РНК-РНК и РНК-белковые взаимодействия, а так же являются принципиально важными для инициации вирусной репликации и для формирования репликативного комплекса с участием вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (Gritsun et al., 2003; Khromykh et al., 2000; Markoff, 2003).

Для некоторых флавивирусов при помощи компьютерного моделирования были предложены две различные модели вторичной структуры РНК 3'-НТО (Gritsun, Gould, 2006; Markoff, 2003). Первая модель, построение которой было сделано независимо от 5'-НТО, предсказывала структуру 3'-НТО, в которой линейные участки разделяли шпилечные структуры SL. Самой консервативной последовательностью 3'-НТО была концевая стабильная шпилька 3'-LSH (рисунок 1.5 а) с прилегающей короткой шпилькой SL2.

Район 3'-LSH содержит консервативный пентануклеотид CACAG, для которого показано принципиальное значение для вирусной инфекционности. По всей вероятности, 3'-LSH взаимодействует с вирусными и клеточными белками внутри полимеразного комплекса, таким образом, иницируя репликацию вирусного генома. Для флавивирусов переносимых комарами (MBFV) и клещами (TBFV) вторичная структура РНК, расположенная проксимально от 3'-LSH-SL2, различна. Так, для MBFV она напоминает «гантель» (DB1). В TBFV вторичная структура РНК проксимальнее 3'-LSH-SL2 имеет Y-образную форму. Y-образная структура и DB1/DB2, описанные ранее (Charlier et al., 2002), были также обнаружены в 3'-НТО NKV(неизвестный вектор) (Turner et al., 2004; Ochsenreiter et al., 2019).

Другая модель вторичной структуры НТО РНК флавивирусов, известная как модель циклизации, была подтверждена экспериментально (Gritsun, Gould, 2006; Markoff, 2003). Она предусматривает взаимодействие между комплементарными последовательностями 3'-НТО и 5'-НТО, что приводит к образованию протяженной двухцепочечной вирусной РНК (рисунок 1.5 b, c) (Turner et al., 2004).



**Рисунок 1.5** Организация генома флавивируса. (А) Организация генома флавивирусов. Вирусный геном содержит единственную открытую рамку считывания (ORF – open-reading frame), которая транслируется в один полипротеин, состоящий из структурных (С, рrМ и Е) и неструктурных белков (NS1, NS2А/В, NS3, NS4А/В и NS5). Известные функции вирусных белков перечислены выше. Вирусный геном фланкирован 5' и 3' нетранслируемыми областями (UTR – untranslated regions), содержащими структуры РНК, необходимые для репликации вируса. 5'-нетранслируемая область кэпирована по первому типу. (В) области РНК флавивируса, необходимые для репликации вирусного генома. 5' UTR состоит из двух створочных петель (SL – stem-loops) – А и В. Створочная петля А (SLA) функционирует как промотор вирусной РНК. 3'

UTR также состоит из нескольких стержневых петель, структур в виде гантели (DB1, 2 – dumb-bell structures), 3' маленьких шпилек (3'sHP – small hairpin), и 3 – 3'SL. Геном также содержит три комплементарные последовательности в 5' и 3' регионах РНК – UAR (upstream AUG region), DAR (downstream AUG region) и CS (conserved sequence). Комплементарные взаимодействия между 5' и 3' областями, облегчающие циркуляризацию вирусного генома, обозначены красными и синими линиями. (С) Предлагаемая модель флавивирусного генома. Предполагается, что геном флавивируса существует в линейной форме, необходимой для трансляции вирусного белка, и в кольцевой форме, необходимой для репликации вирусного генома (Filomatori et al., 2006; Choi, 2021)

В модели циклизации верхняя часть 3'-LSH складывается как независимая структура, подразумевая, что модели линейной 3'-НТО и циклизации 3' и 5'-НТО перекрываются, возможно, представляя две переходные стадии в формировании комплексного вирусного промотора РНК (Gritsun, Gould, 2006). Y-образная структура является жизненно важной конформацией РНК, что подтверждено экспериментальными данными (Chausov et al., 2010; Mandl et al., 1998; Pletnev, 2001).

Границы 3'-LSH всех флавивирусов практически совпадают с границами между LRS1 и LRS2. Границы Y-образных структур также почти совпадают с границей между LRS2/LRS3. Предполагается, что различные конформации РНК различных флавивирусов могли произойти от дублированных «древних» LRS, которые сохранились только для группы TBFV. Сохранение дублированного участка, соответствующего LRS3 или LRS4, происходило, по всей вероятности, несколько раз (Gritsun, Gould, 2006). Этот процесс сопровождался удвоением всего 3'-НТО с возникновением последующих делеций в этом районе вирусного генома.

Отличительной особенностью 3'-НТО является наличие прямых повторов (DR), состоящих из 20-70 повторяющихся нуклеотидных последовательностей, разделенных неповторяющимися нуклеотидными последовательностями

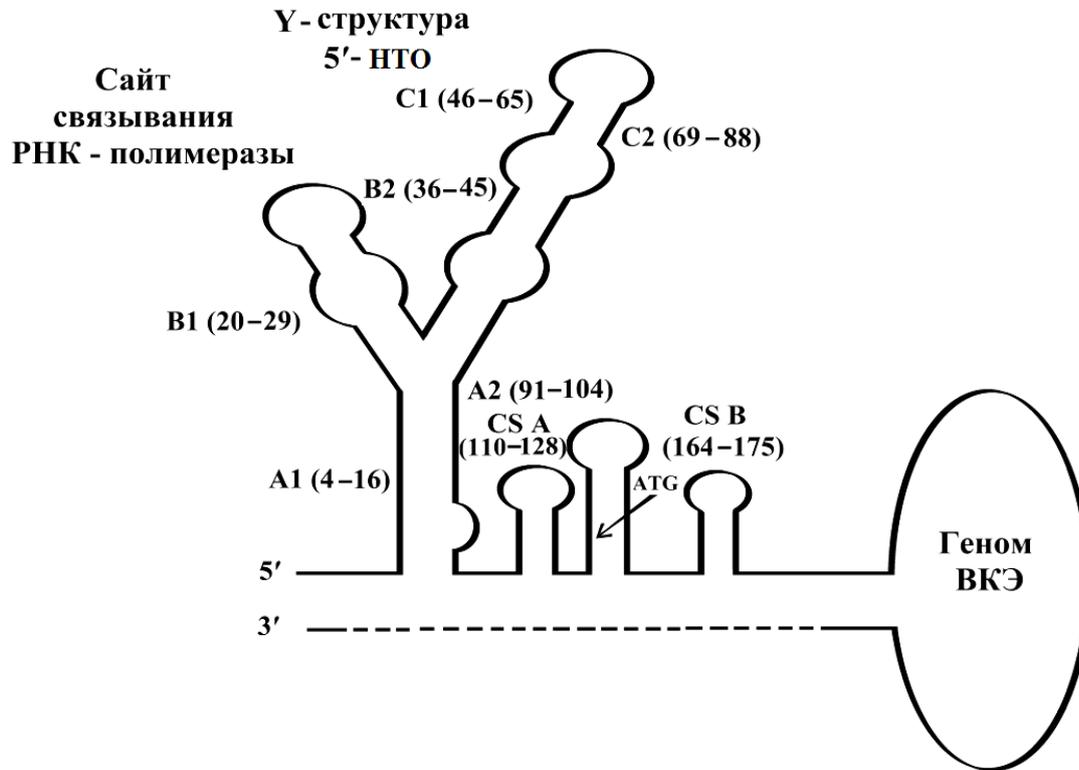
различной длины. Экспериментальное удаление некоторых DR не приводит к потере жизнеспособности вируса (Mandl et al., 1998; Алексеева и др., 2021). Поиск максимальной гомологии между удаленно расположенными регионами 3'-НТО группы TBFV позволил выявить 6 длинных повторяющихся LRS (~200 нуклеотидов), каждый из которых, возможно, впоследствии эволюционировал до более коротких DR, обозначенных как R1, R2 и R3 (Gritsun, Gould, 2006).

Анализ различных представителей MBFV: вирусов японского энцефалита (JEV), вирусов лихорадки денге (DENV) и вируса желтой лихорадки (YFV), показал, что, по всей вероятности, все их DR эволюционировали из общего предшественника для MBFV и впоследствии независимо изменялись для различных представителей MBFV. Вполне возможно, что DR в различных группах флавивирусов происходят от LRS характерных для флавивирусов относящихся к TBFV. Высказывается предположение, что эти районы при смене клеток хозяина могут играть важную роль в обеспечении выживания вируса, обеспечивая репликацию геномной РНК в клетках различных хозяев (Ternovoi et al., 2019).

Исследование генетической вариабельности 5'-концевой области ВКЭ в инфицированных клещах (Casati et al., 2006), показало необычно высокую вариабельность этого района генома ВКЭ. Авторам не удалось обнаружить ни одного полностью гомологичного варианта ВКЭ в 44 индивидуальных инфицированных клещах по 5'-концевому району. Уровень вариабельности этого района авторы оценили в 55,5%, что необычайно высоко для этого принципиально важного регуляторного района вирусного генома. Обнаруженный высокий уровень изменчивости 5'-концевого района вирусной РНК даже позволил авторам высказать предположение, что именно эта изменчивость связана с возможностями адаптации ВКЭ к репликации вирусной РНК в клетках различных видов хозяев. Известно также, что вторичная структура РНК чувствительна к возникновению мутаций (Marin, 1995).

Принято считать, что для репликации флавивирусной РНК необходима циклизация генома с образованием дцРНК из последовательностей 5' и 3'-НТО и

формированием структуры типа "сковорода с ручкой" (Chausov et al., 2010; Filomatori et al., 2006) (рисунок 1.6). Последовательность внутри консервативной петли "А" (A1, A2) опознается вирусной РНК-полимеразой, что необходимо для начала синтеза минус-цепи вирусной РНК.



**Рисунок 1.6** Предполагаемая вторичная структура генома вируса клещевого энцефалита с обозначением основных структурных элементов 5'-НТО. Вторичная структура 5'-НТО геномной РНК ВКЭ предсказана с помощью сервера MFOLD 3.4 (Markham и Zuker, 2008).

Нуклеотидные замены в элементах CS A и CS B могут блокировать репликацию, даже если элементы не теряют способность образовывать стабильные комплексы с 3'-НТО (Alvarez et al., 2008). Показано, что варибельная область 5'-НТО геномной РНК критична для вирулентности у мышей, а различия в 5'-НТО РНК природных вариантов ВКЭ приводят к различиям в эффективности репликации вируса (Sakai et al., 2015). Варибельность в 5'-НТО связывают также с адаптацией вируса к новым видам хозяев. Возможно, на особенности

организации 5'-НТО влияет также длительность локальной микроэволюции ВКЭ в природных экосистемах (Casati et al., 2006; Chaousov et al., 2010).

### 1.6 Цикл репродукции флавивирусов

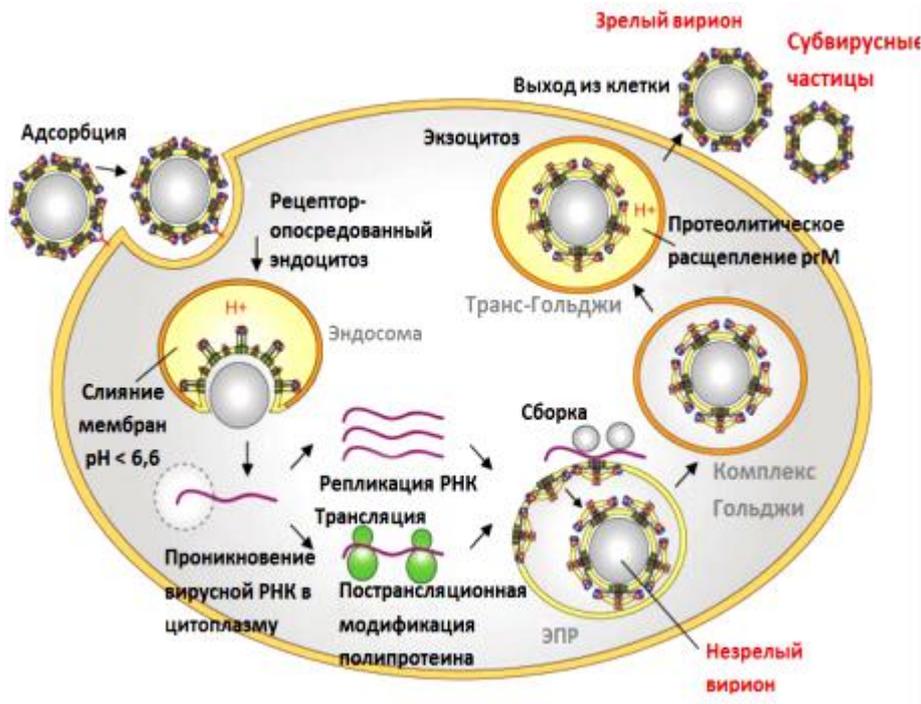
ВКЭ характеризуется достаточно широким клеточным тропизмом и способен размножаться *in vitro* во многих клеточных линиях млекопитающих, членистоногих и птиц. Связывание с рецепторами клетки-хозяина происходит путем взаимодействия с рецепторами димеров белка Е. Однако, не только у ВКЭ, но и у всех флавивирусов связывание вируса с поверхностью перmissive клеток и начальные события вирус-клеточного взаимодействия еще подробно не изучены. Используя антитела, имитирующие гемагглютинирующие эпитопы белка Е, было показано, что ламининовый рецептор человека действует как специфический рецептор на поверхности клетки (Protoporova et al., 1999).

Также предполагается, что в организме сорбция и дальнейшее необратимое связывание вириона с клеткой могут быть опосредованы компонентом С3 комплемента, Fc-детерминантой иммуноглобулинов или с участием специфических антител, когда уровни их концентрации значительно ниже, чем титры нейтрализации (Rice, 1996).

После прикрепления вириона к поверхности клетки происходит впячивание клеточной мембраны, где происходит эндоцитоз. В эндосоме при низком значении рН белок Е претерпевает необратимые конформационные изменения, переходя из димерной формы в тримерную, и индуцирует слияние вирусной и эндосомальной мембран (Allison et al., 1995).

Иногда можно наблюдать прямое слияние мембран. Более детальные механизмы процессов раздевания вируса, трансляции интегрированной 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 структуры еще не исследованы.

Предлагаемая схема внутриклеточного жизненного цикла флавивирусов показана на рисунке 1.7.



**Рисунок 1.7** Схематическое изображение жизненного цикла флавивируса (адаптировано из (Davis et al., 2006)).

После стадий связывания с клеткой, эндоцитоза вириона, слияния и "плавления" мембран происходит раздевание нуклеокапсида и геномная РНК высвобождается в цитоплазму. Вирусная РНК, благодаря комплементарности 5' и 3' концевых последовательностей, циклизуется и принимает форму "сковороды с ручкой". Вторичная структура "ручки" является регуляторным элементом для рибосом клетки-хозяина и вирусного полимеразного комплекса. Вирусный полипротеин транслируется вдоль матрицы вирусной РНК в сочетании с процессингом. Образующиеся белки репликативного комплекса транскрибируют (–) цепи вирусной РНК, которые служат матрицей для синтеза (+) цепей. Синтез РНК происходит в цитоплазматических репликационных комплексах, связанных с околядерными мембранами. Синтез (+) и (–) цепей количественно асимметричен, их количества находятся в соотношении 10:1 соответственно. Синтезированная (+)-цепочка вирусной РНК связывается в цитоплазме с высокоосновным белком С, который изначально находится в незрелой форме. Эта

форма состоит из белков С и ргМ, соединенных гидрофобной сигнальной последовательностью, пронизывающей мембрану эндоплазматического ретикулума (ЭПР) так, что белок С экспонирован в цитоплазму, а ргМ – в просвет ЭПР (Nowak et al., 1989). Сигнальная последовательность несет сайт протеолиза для вирусной протеазы NS2B/NS3 из цитоплазмы. Расщепление в этом месте высвобождает зрелый белок С, образуя прокапсид вокруг вирусной РНК (Amberg et al., 1994).

Сигнальная последовательность в мембране "перетаскивается" в направлении просвета ЭПР, в то время как сайт протеолиза для передачи сигналов клетке-хозяину становится доступным. Расщепление в этом месте высвобождает белок ргМ. Полученный прокапсид проходит через мембрану ЭПР, где расположены белки ргМ и Е, получая, таким образом, липидную оболочку с поверхностными белками. Созревание белка С, образование нуклеокапсида и его прохождение через мембрану ЭПР происходит как почти непрерывный процесс (Mukhopadhyay et al., 2005).

Затем, следуя по секреторному пути в клетке-хозяине, незрелый вирион переходит к плазматической мембране. Непосредственно перед высвобождением вириона из клетки клеточная протеаза фурин расщепляет белок ргМ с образованием структурного белка М зрелого вириона ВКЭ (Stadle et al., 1997). Параллельно молекулы белка Е, высвобождаемые из комплекса ргМ-Е, димеризуются. Предполагается, что белок ргМ необходим для предотвращения образования тримеров белка Е в условиях низкого рН в транспортной сети аппарата Гольджи (Heinz, Allison, 2003).

Антитела к белку ргМ могут способствовать протективному иммунитету путем нейтрализации вирионов, содержащих антиген ргМ, расположенных на поверхности клетки. Мутации в белке ргМ влияют на уровень секреции вирусных частиц, например, замена пролина на серин в положении 63 а.к. приводит к снижению секреции почти в 5 раз, предположительно из-за нарушения прохождения вириона через мембрану ЭПР (Yoshii et al., 2004).

Значительные экспериментальные данные, указывающие на взаимосвязь между механизмом репликации вируса в инфицированной клетке и патогенезом инфекции клещевого энцефалита, были получены Морозовой О.В. и соавторами в результате изучения репликативного комплекса ВКЭ с участием клеточных белков, вирусных неструктурных белков NS5, NS3 и вирусной РНК (Морозова, 2001). Основываясь на полученных результатах, предположили, что РНК-зависимый синтез может регулироваться путем изменения состава репликативного комплекса, состоящего из вирусных и клеточных белков. Высвобождение белка NS5 из комплекса приводит к переключению синтеза с "минусовых" цепей РНК на геномные РНК. Уменьшение доли белка NS3 в составе мембраносвязанных вирусных белковых комплексов может ингибировать скорость синтеза геномных РНК, что может быть одной из причин реализации процесса медленной персистирующей инфекции (Морозова, 2001).

Клетки, инфицированные флавивирусами, в дополнение к зрелым вирусным частицам, также выделяют медленно седиментирующие частицы с внешним размером 14 нм, состоящие из корпускулярных агрегатов вирусных белков Е и М (Russel et al., 1980). Эти неинфекционные частицы являются эффективными иммуногенами (Colombage et al., 1998). В клетках, инфицированных флавивирусами, происходят хорошо выраженные ультраструктурные изменения, включая вакуолизацию, пролиферацию внутриклеточных мембран (Ng, Hong, 1989).

Инфекция часто носит цитотоксичный характер, хотя некоторые клетки сохраняются и, таким образом, становятся хронически инфицированными. Даже на стадии максимальной репликации вируса не наблюдается значительного ингибирования синтеза клеточных макромолекул (Гайдамович, 1996; Monath, Heinz, 1996).

Репликация геномной РНК происходит в цитоплазме по полуконсервативному механизму, инициация трансляции осуществляется по кЭП-зависимому механизму.

## 1.7 Дивергенция и эволюция ВКЭ

Одна из основных гипотез распространения вируса клещевого энцефалита заключается в том, что вирусы распространялись через евроазиатский континент в западном направлении (Zanotto et al., 1995). Оценка скорости дивергенции флавивирусов показала, что клещевые флавивирусы, имеют более низкую скорость дивергенции по сравнению с флавивирусами передающимися через укус комара (Zanotto, 1996).

Время расхождения Сибирского и Дальневосточного генотипов можно оценить в 1700-2100 лет (Локтев и др., 2007). Такой значительный период коэволюции ВКЭ показывает, что распространение вариантов ВКЭ по северу Евро-Азиатского континента произошло вне влияния современной технической цивилизации, и было связано с естественными механизмами распространения этого природно-очагового заболевания.

Также предполагается, что дальневосточный генотип постепенно вытесняет другие генотипы в России (Локтев и др., 2007).

Существует также альтернативное мнение о том, что в настоящее время, в основном, распространяется сибирский генотип (Погодина и др., 2007). Однако большинство исследователей сходятся во мнении, что географический ареал распространения ВКЭ совпадает в основном с ареалом обитания иксодовых клещей. В европейской части это *I. ricinus*, а в восточных регионах Европы и в азиатской части – *I. persulcatus* (Grard et al., 2007; Gritsun et al., 2003). Как было показано при изучении среды обитания *I. scapularis* в Канаде, среда обитания клещей может значительно варьироваться: северная граница зоны обитания клещей может смещаться в пределах 200-1000 км по оси юг-север в зависимости от сдвига среднегодовой температуры всего на несколько градусов (Ogden et al., 2006).

Современные исследования достаточно полно описывают климатические изменения на Земле за последние несколько тысяч лет (Mann et al., 2009; Alley et al., 2010). Ближайший к нашему времени ледниковый период закончился около 10 тысяч лет назад. Эта дата является ключевой для понимания того, как

флавивирусы освоили новые территории на севере Евразии и Америки после таяния ледников. Также описаны дальнейшие периоды сильных похолоданий с последующим потеплением, которые могли существенно изменить районы распространения иксодовых клещей и, соответственно, скорость эволюции флавивирусов на северных территориях Евразии и Америки. Самые близкие к нам значительные похолодания относятся к периодам около 2200-1900, 1550-1150, 830-655 и 400-200 лет назад, когда средняя температура ледников Гренландии, например, могла снизиться на 2-3 градуса (Alley et al., 2010). Последний период похолодания, описанный в многочисленных документах, даже получил название "Малый ледниковый период" (Mann et al., 2009). Обращает на себя внимание совпадение времени возникновения основных узлов дивергенции клещевых флавивирусов и периодов потепления/похолодания. Так, около 2250 лет назад произошло разделение сибирского и дальневосточного генотипов ВКЭ, что удовлетворительно соответствует времени похолодания после известного периода "римского потепления". Узлы расхождения внутри генотипов также совпадают по времени с похолоданием после "Средневекового потепления", с так называемым "Малым ледниковым периодом". Скорее всего, изменения температуры привели к значительным изменениям в природных ландшафтах северной Евразии, которые могли быть факторами, способствующими расхождению филогенетических групп ВКЭ (Субботина, Локтев, 2012).

Совпадение времени расхождения основных генотипов ВКЭ со временем известных исторических периодов потепления и похолодания позволили выдвинуть гипотезу о том, что резкие изменения климата послужили важнейшим фактором эволюции флавивирусов за последние тысячелетия (Субботина, Локтев, 2012).

Пример необычного распространения ВКЭ связан с Японией, где в 1993 году клещевой энцефалит был впервые обнаружен у нескольких человек на южном острове Хоккайдо (Takashima et al., 1997). ВКЭ был изолирован в 1995 году от собак в районе Ошима на юге острова. В 1996 году удалось изолировать ВКЭ от грызунов и клещей (Takeda et al., 1999). Генотипирование этих вариантов

позволило отнести их к дальневосточному подтипу ВКЭ (Takashima et al., 2001). Филогенетический анализ ошимских штаммов и изолятов из Хабаровского края в 1998 году показал, что дивергенция этих штаммов произошла 230-460 лет назад. Авторы выдвинули гипотезу о том, что японские варианты произошли от дальневосточных штаммов ВКЭ. Две основные гипотезы проникновения ВКЭ на Хоккайдо - это занесение зараженных клещей перелетными птицами или ввоз зараженных грызунов морскими судами. Штаммы Ошима, выделенные из разных источников, имеют минимальные различия в структуре нуклеотидов между собой. Это дополнительно указывает на то, что интродукция дальневосточного подтипа ВКЭ на Японские острова произошла относительно недавно, расхождения штаммов не было, и гипотеза о возможности быстрого распространения высокопатогенного дальневосточного подтипа ВКЭ обоснована.

Высокий потенциал генетической изменчивости дальневосточного генотипа ВКЭ был продемонстрирован определением полных нуклеотидных последовательностей двух китайских штаммов Senzhang(JQ650523) и MDJ-01(JQ650522) в GenBank в 2002-2003 годах. К сожалению, данные, описывающие эпидемиологию, патогенез и другие особенности этих штаммов, отсутствуют в доступной литературе. Известно только, что штамм Senzhang был выделен в 1953 году. Филогенетический анализ полноразмерных последовательностей показывает, что эти штаммы представляют отдельную группу ВКЭ, принадлежащую к дальневосточному подтипу ВКЭ. Время их дивергенции с вирусами группы Ошима и Софьин, широко распространенными в Приморском и Хабаровском краях, составляет примерно около 320-490 лет. Эти данные свидетельствуют о более значительном генетическом разнообразии ВКЭ, чем считалось ранее (Takashima et al., 2001).

### **1.8 Генетическое разнообразие вируса КЭ, изменение структуры вирусной популяции**

Развитие методов иммуно- и генотипирования ВКЭ выявило антигенную и генетическую гетерогенность штаммов. В настоящее время, официально

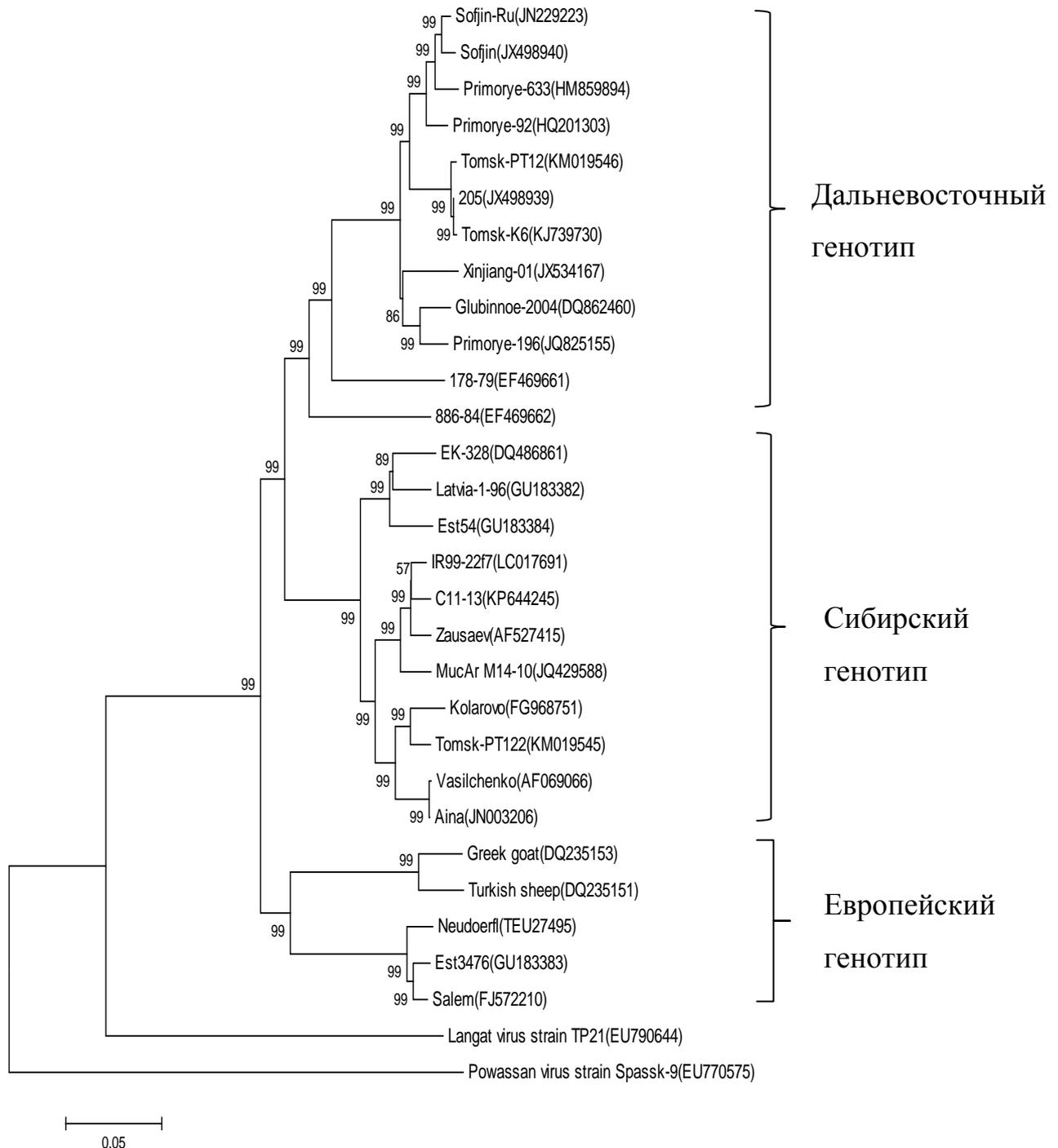
принятой Международным комитетом по таксономии вирусов классификацией признано существование трех подтипов (субтипов/генотипов) ВКЭ – дальневосточного (основной переносчик – клещ *I. persulcatus*); восточносибирского или урало-сибирского (основной переносчик – клещ *I. persulcatus*) и европейского или западного (основной переносчик – клещ *I. ricinus*) (рисунок 1.8).

В. И. Злобин обозначает эти подтипы, как генотипы 1, 2, 3 (Zlobin et al., 2007). Подтипы ВКЭ подразделяются на кластеры. Grard et al. (Grard et al., 2007) предложили пересмотреть таксономию ВКЭ, в частности, объединить дальневосточный и сибирский подтипы. Эта позиция не разделяется В. Б. Локтевым (Loktev, 2007) и другими специалистами. Grard et al. (Grard et al., 2007) проводили генетическое сопоставление прототипных штаммов каждого подтипа без учета их генетического разнообразия. Ряд авторов (Zlobin et al., 2007) исследовали обширные наборы штаммов ВКЭ, что позволило не только установить различия дальневосточного и сибирского подтипов, но и показать широту распространения сибирского подтипа и его доминирование на большей части территории России за пределами Дальнего Востока.

При построении филогенетических деревьев общепринятым методом в настоящее время является анализ нуклеотидной последовательности фрагментов гена белка Е ВКЭ.

Сибирский подтип подразделяется на азиатский и восточноевропейский топоварианты, и внутри каждого топоварианта выделяют по 2 подгруппы в зависимости от маркерной аминокислоты, находящейся в позиции 234 гена белка Е (Карань и др., 2006). Прототипным штаммом для одной из азиатских подгрупп является штамм Заусаев (содержит в маркерной позиции 234 гистидин), для другой – штамм Васильченко (содержит в данной позиции глутамин). Аналогично для восточноевропейских штаммов – в одной подгруппе прототипным является штамм Yaroslavl-142, содержащий в маркерной позиции гистидин, а другую подгруппу составляют подтип вологодские штаммы с уникальной мутацией в

позиции 234 – тирозин вместо гистидина или глутамина (прототипный штамм Vologda-658) (Карань и др., 2006; Погодина и др., 2007; Колясникова, 2008).



**Рисунок 1.8** Филогенетическое дерево, построенное для полноразмерных нуклеотидных последовательностей, взятых из базы данных GenBank. Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-х параметрической модели Кимуры.

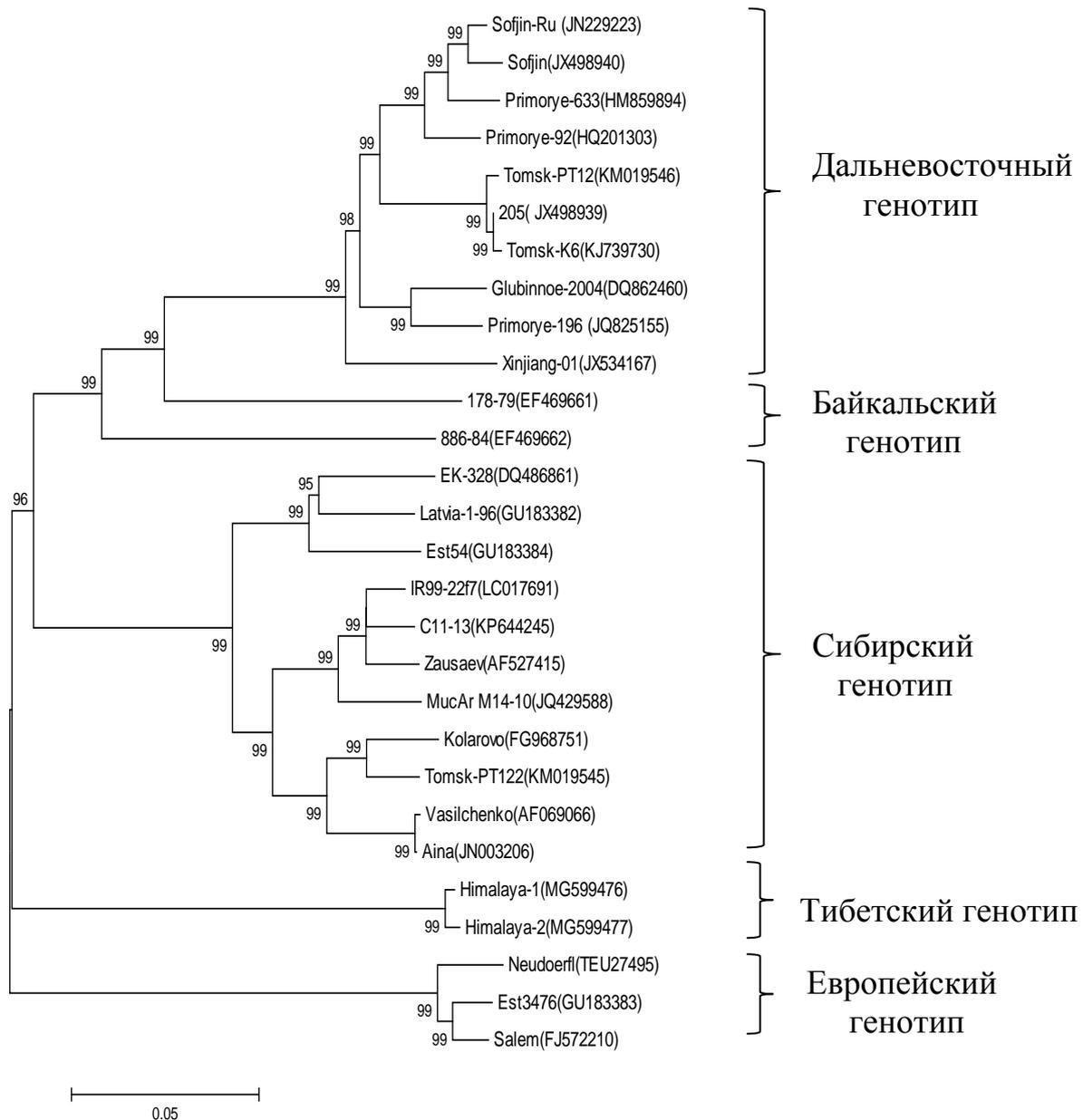
В целом европейская популяция сибирского подтипа неоднородна. Так, была выделена балтийская группа штаммов, которая рассматривается как отдельный кластер. Между тем, финские штаммы DQ451293-Kokkola-84, DQ451296-Kokkola-118, DQ451295-Kokkola-102, DQ451294-Kokkola-86 наиболее близки вологодским штаммам FJ214138-Vologda-911-74, Vologda-208-98, и ярославскому штамму FJ214144-Yaroslavl-80 (Карань и др., 2006; Погодина и др., 2007; Колясникова, 2008).

Уникальные геноварианты ВКЭ были также выявлены в Кемеровской области. В частности, изоляты 377 и 294, выделенные из клещей в Кемеровском и Крапивинском районах (Ефимова и др., 2015).

В регионах Восточной Сибири и на территории Монголии выявлены штаммы – 178-79, 886-84, Himalaya-1 и Himalaya-2 (Злобин и др., 2007; Козлова и др., 2012; Dai et al., 2018) (рисунок 1.9). Своеобразие этих штаммов заключается в мозаичной структуре генов, содержащих участки геномов двух и даже трех известных подтипов ВКЭ (Карань и др., 2007). В настоящее время штамм 178-79 рассматривается как самостоятельный генотип 4 (Байкальский), представленный единственным штаммом, а касательно штамма 886-84 – выявлена большая группа, насчитывающая 21 штамм, гомологичный прототипному (Козлова и др., 2012; Козлова и др., 2018).

«Байкальский» генотип (прототипный штамм 886-84) эволюционно занимает промежуточное положение между Дальневосточным и Сибирским генотипами ВКЭ и встречается на ограниченной территории в Восточной Сибири и Монголии (Козлова и др., 2018).

Филогенетический анализ гена белка E и полипротеина у штаммов, выделенных на территории Монголии (Dai et al., 2018) от диких грызунов, показал, что два штамма Тибетского клещевого энцефалита образовали самостоятельную ветвь, отдельную от Европейского, Сибирского и Дальневосточного генотипов. Некоторыми авторами предложено было их выделить в отдельный, самостоятельный генотип 5 (Тибетский) (Джиоев и др., 2012; Демина и др., 2012; Козлова и др., 2012; Kovalev, Mukhacheva, 2017).



**Рисунок 1.9** Филогенетическое дерево, построенное для полноразмерных нуклеотидных последовательностей ВКЭ различных генотипов, взятых из международной базы данных GenBank. Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-х параметрической модели Кимуры.

Новым направлением в молекулярной эпидемиологии стал мониторинг вирусных популяций на основе изучения хронологических рядов штаммов (Погодина и др., 2007; Колясникова, 2008). Проводилось генотипирование изолятов РНК и штаммов ВКЭ, за разные временные интервалы. Было

прослежено изменение генетической структуры популяций ВКЭ за почти 70-летний период в Свердловской области (Погодина и др., 2007; Колясникова, 2008), за 50 лет – в Кемеровской области (Колясникова, 2008; Ефимова и др., 2015), за 30 лет – в Курганской, Ярославской областях (Погодина и др., 2007; Колясникова, 2008; Герасимов, 2012).

В Свердловской области в 1939–1945 гг. доля дальневосточного подтипа достигала свыше 95%, в 1959–1960 гг. – доли обоих подтипов были почти равными, а в 2003–2007 гг. доля сибирского подтипа достигала 95% и выше (Погодина и др., 2007; Колясникова, 2008). В Кемеровской области в 1953–1963 гг. соотношение дальневосточного и сибирского подтипов ВКЭ также было почти равным, а начиная с конца 1960-х – начала 1970-х годов доля дальневосточного подтипа ВКЭ стала снижаться (Погодина и др., 2007; Колясникова, 2008). В 2003–2015 гг. на территориях обоих регионов доля сибирского подтипа в исследованных вирусных популяциях равна 98–100% (Ефимова и др., 2015; Колясникова, 2008; Погодина и др., 2007). В Курганской области сибирский подтип доминировал на протяжении всего периода наблюдений, а в современный период популяция его достигла 100% (Погодина и др., 2007; Колясникова, 2008).

Также в 2014 г. сибирский подтип ВКЭ составлял до 100% вирусных популяций в республиках Тыва (Мельникова и др., 2014), Хакасия и Красноярском крае (Верхозина, 2014). Имеющиеся данные позволяют считать, что в Красноярском крае также произошло изменение генетической структуры популяции ВКЭ за 30-летний период. Так, в 2002–2003 гг. был обследован биоматериал (ткани различных отделов ЦНС) от пяти умерших пациентов из Красноярского края. Все изоляты ВКЭ принадлежали к сибирскому подтипу (Хаснатинов и др., 2010).

Изменения в структуре популяции ВКЭ выявлены и на территории Центрального федерального округа России. В Ярославской области в 1983–1989 гг. доля дальневосточного подтипа превалировала – он был выявлен в клещах *I. persulcatus* при отсутствии в них сибирского подтипа (Герасимов, 2012). В 1990–1993 гг. отмечался так называемый период симпатрии, когда были выявлены 6

микст-штаммов (политиповых штаммов), содержащих геномы дальневосточного и сибирского подтипов из клещей и от больных КЭ (Герасимов, 2012; Погодина и др., 2012). С конца 90-х годов XX века по настоящее время сибирский подтип абсолютно доминирует в регионе, РНК дальневосточного подтипа не была обнаружена ни в одном экземпляре клеща или биоматериале от больных (Герасимов, 2012).

Так, за разные периоды времени в регионах Урала, Западной и Восточной Сибири, а также ЦФО прослежено изменение генетической структуры вирусной популяции возбудителя КЭ, в результате которого общим является вытеснение из популяции дальневосточного подтипа.

Произошедшие изменения впервые описаны как феномен смены подтипов ВКЭ (Погодина и др., 2007). Отмечена связь этого явления с антропогенной трансформацией естественных ландшафтов.

На примере некоторых регионов (Вологодская область) показано абсолютное доминирование сибирского подтипа, однако не было прослежено изменение структуры популяции во времени за период наблюдений (Колясникова, 2008; Лесникова и др., 2015).

Одновременно с этим, на ряде территорий, наблюдается коциркуляция двух и даже трех подтипов ВКЭ – Иркутская область, Забайкальский край и другие (Ternovoi et al., 2003; Верховина, 2014). О смене доминирующего подтипа ВКЭ на определённой территории также свидетельствуют изменения иммунной структуры у проживающего на ней населения.

В 1978–1979 гг. была изучена структура естественного иммунитета у населения разных регионов с выявлением в реакции нейтрализации антител, избирательно реагирующих со штаммами сибирского и дальневосточного подтипов ВКЭ. В Красноярском крае из общего числа серопозитивных сывороток 12% реагировали только со штаммом Айна сибирского подтипа, 27% – со штаммом Софьин дальневосточного подтипа и 63% – со штаммами обоих подтипов, в Курганской области – соответственно 8%, 6,5% и 85,5%. В Ярославской области сывороток, реагирующих со штаммом Айна, не было

выявлено, со штаммом Софьин – 28%. Полученные данные свидетельствуют о циркуляции на данной территории в указанные годы дальневосточного подтипа ВКЭ (Погодина и др., 1986). В настоящие годы на данных территориях абсолютно доминирует сибирский подтип, что доказано выделением большого количества штаммов и изолятов ВКЭ (Верхозина, 2014).

Проведенные исследования позволяют сделать вывод, что смена подтипов ВКЭ имеет единую направленность – исчезновение дальневосточного подтипа и замещение его сибирским, однако происходит это асинхронно и не во всех природных очагах КЭ.

В период симпатрии двух подтипов ВКЭ из клещей, из крови больных и из мозга погибших пациентов в ряде регионов выделяли микст-штаммы (политиповые штаммы), сочетающие фрагменты геномов двух подтипов в области генов E и NS1 (Карань и др., 2007; Колясникова, 2008; Погодина и др., 2007). Расчет частоты изоляции микст-штаммов показывает, что они составляют до 15–18% вирусной популяции (Погодина и др., 2012).

Проблема смены подтипов ВКЭ и сам этот термин стали предметом дискуссии. Существуют разные гипотезы о причинах этого явления. Факт исчезновения из вирусной популяции дальневосточного подтипа не оспаривается. Однако термин «смена подтипов» отрицается в частности С. Ю. Ковалевым (Ковалев, Мухачева, 2011), уделившим особое внимание условиям появления и исчезновения дальневосточного подтипа, связывая их с реализацией программы переселения ценных пород зверей и птиц в 1930–1990 гг., когда около полумиллиона особей животных были переселены с Дальнего Востока. С. Ю. Ковалев показал, что среди штаммов ВКЭ в Свердловской области в 1966–1986 гг. дальневосточный подтип составлял 18,6% (Ковалев, Мухачева, 2011), и выделение единственного и последнего на настоящий момент штамма дальневосточного подтипа (что составило 0,003% от выделенных изолятов в регионе) датируется 2007–2008 гг.

Однако, данная гипотеза имеет ряд серьезных противоречий. Переселение полумиллиона особей животных недостаточно для обширных пространств, на

которых (вне Дальнего Востока) выявлен дальневосточный подтип ВКЭ. Известны успешные примеры переселения (ондатра) и неудачные (ценные виды соболя) (Колясникова и др., 2020). Грызуны, являющиеся основными прокормителями клеща на ранних стадиях развития, не могли входить в перечень переселяемых видов животных.

В другой гипотезе (Липин, Жезмер, 1983) основное внимание уделяется антропогенной трансформации естественных природных ландшафтов, хотя не уточняется, как именно изменения природных очагов, клещей, прокормителей и других факторов способствуют доминированию сибирского подтипа ВКЭ.

Третья гипотеза уделяет основное внимание особенностям штаммов сибирского подтипа, которые благоприятствовали его широкому распространению в природе. К таким особенностям относятся выраженная способность к персистенции (Погодина и др., 1986), которая чаще всего наблюдается у заражённых животных-прокормителей клещей. Другой особенностью является антигенная дефектность штаммов, выделенных из клещей. Штаммы, лишённые гемагглютинирующей и преципитирующей активности, имеют уникальные точечные мутации, способны распространяться двумя видами клещей – *I. ricinus* и *I. persulcatus*, при этом они могут передаваться неvirемическим путём от заражённых клещей к незаражённым (Колясникова и др., 2020).

### **1.9 Хозяин-специфические генетические детерминанты флавивирусов**

Флавивирусы, являясь возбудителями наиболее распространенных вирусных заболеваний, передаваемых членистоногими во всем мире, включают большое количество патогенных для человека вирусов, таких как вирус денге (DENV), вирус Зика (ZIKV), вирусы желтой лихорадки (YFV) и Западного Нила (WNV). Они эндемичны более чем в 100 странах, где ежегодно регистрируется около 390 миллионов случаев инфицирования (Bhatt et al., 2013).

В 2016 году Латинская Америка столкнулась с сильнейшей эпидемией DENV и ZIKV, а с 2017 года угрозой для Южной Америки стал YFV, несмотря на существование эффективной живой аттенуированной вакцины (Mir et al., 2017).

Геном флавивирусов представляет собой одноцепочечную молекулу РНК (+), которая кроме последовательности кодирующей гены структурных и не структурных белков содержит информацию и о не структурных РНК, функционирующих как сигналы для усиления или подавления репликации вирусов (Iglesias et al., 2017). Последовательности в этих структурах РНК могут быть детерминантами, влияющими на эпидемиологию вируса, патогенез, адаптацию к хозяину и эффективность передачи вируса от векторов и людей (Manokaran et al., 2015; Villordo et al., 2015; Filomatori et al., 2017). О том, как эти сигналы РНК функционируют при флавивирусных инфекциях, за последние десятилетия было многое изучено, но до сих пор мало что известно об их молекулярных механизмах действия.

**5' и 3'-НТО.** 5'-нетранслируемая область флавивирусов включает два важных элемента для репликации вирусного генома:

- промотор для синтеза РНК, известный как стеблевая петля А (SLA);
- последовательности циклизации, которые опосредуют РНК-РНК-взаимодействия 5' и 3'-НТО (Filomatori et al., 2006).

Организация 3'-НТО ВКЭ аналогична таковой у других флавивирусов и содержит как элементы для вирусной репликации, так и вспомогательные структуры РНК, которые участвуют как в регуляции вирусной репликации, так и в управлении противовирусными реакциями хозяина (Brinton, Miller, 2015). Интересной особенностью 3'-НТО геномов флавивирусов является эволюционная консервативность этих последовательностей и наличие повторов в структуре РНК (Gritsun, Gould, 2006c; Gritsun et al., 2014). 3'-НТО содержит две почти идентичные структуры – стебель-петля (SLI и SLII), два элемента напоминающие гантели (DB1 и DB2), маленькая шпилька (sHP) и 3' структура стебель-петля (3' SL), общая для всех флавивирусов (Shurtleff et al., 2001; Villordo et al., 2016). Две пары повторяющихся элементов РНК (SLI-SLII и DB1-DB2) приобретают

стабильные вторичные структуры, включая взаимодействия псевдоузлов (ПК), которые способны предотвращать деградацию генома нуклеазами (Pijlman et al., 2008; Funk et al., 2010). При флавивирусной инфекции SLI и SLII несут ответственность за генерацию и накопление некодирующих вирусных РНК как продуктов частичной деградации генома и известны как субгеномные РНК флавивирусов (sfRNA) (Filomatori et al., 2017; Chapman et al., 2014). Эти sfRNA играют важную роль в противодействии противовирусным реакциям запускающимся в клетках комаров и человека (Villordo et al., 2016; Moon et al., 2015; Goertz et al., 2019; Clarke et al., 2015). Биологическое значение сохранения двух практически идентичных структур РНК в 3'-НТО флавивирусов не известно. Анализ последовательностей флавивирусов показал, что повторяющиеся мотивы и дубликации связаны с вирусным эволюционным процессом множественной смены хозяев (Gritsun, Gould, 2007). Недавние экспериментальные данные, полученные при изучении функции дублированных SL в DENV, поддерживают модель, в которой дубликация РНК позволяет вирусу лучше адаптироваться для одного хозяина (комаров), но при этом не эффективна для других хозяев (для человека) и обеспечивает устойчивое во времени переключение между хозяевами (Villordo et al., 2015).

Есть исследования, в которых были определены роли других структур вирусной РНК для репликации флавивирусов в двух хозяевах (Villordo et al., 2015; de Vorba et al., 2015; Markoff et al., 2002). Эти наблюдения, в свою очередь, вызвали вопросы, касающиеся механизмов, с помощью которых структуры вирусной РНК работают у комаров и у людей, а также о последствиях генетических замещений в 3'-НТО при передаче и адаптации к новому хозяину и в патогенезе хозяина. В связи с этим, в регионах эндемичных и гиперэндемичных, коциркуляция разных генотипов флавивирусов может приводить к смещению установившихся там ранее штаммов, а как следствие иных клинических исходов (Andrade et al., 2016; Fontaine et al 2018). Это подчеркивает важность понимания причины изменчивости последовательности генома в естественных условиях. Интересно, что изменчивость в 3'-НТО флавивирусов отчетливо коррелирует с

эпидемиологическим процессом, в который вовлечен вирус (Manokaran et al., 2015). Так, каждая из дублированных структур РНК в вирусной 3'-НТО находится под различным селективным давлением. Анализ различных последовательностей РНК DENV позволил картировать адаптивные мутации только в одной из двух DB структуре. При использовании рекомбинантных вирусов с идентифицированными мутациями в DB, большое преимущество репликации вируса в клетках комаров было связано с изменениями в последовательности DB2. В результате, анализ показал, что два DB элемента дифференциально регулируют циклизацию генома, которая является конформационно необходимой для синтеза вирусной РНК. Ранее было показано, что последовательности в DB1 гибридизуются с участком, присутствующим в кодирующей последовательности капсида, способствующим циклизации генома (de Vries et al., 2015). Дублированные структуры DB, присутствующие в 3'-НТО вирусной РНК, обеспечивают репликационную активность у обоих хозяев и эффективно обеспечивают адаптацию вируса для каждого из хозяев. Таким образом, вирусные РНК-структуры в 3'-НТО геномов флавивирусов, находясь под различным селективным давлением в разных хозяевах, в процессе эволюции флавивирусов сформировали сложный механизм адаптации вируса к различным хозяевам.

Структуры DB, присутствующие в большинстве геномов флавивирусов, со специфическими для различных хозяев активностями, обеспечивают эффективную репликацию вирусной РНК. С помощью модели основанной на вторичной структуре РНК удается объяснить, как структуры DB регулируют конформацию вирусного генома и тем самым изменяют эффективность синтеза вирусной РНК. Было установлено образование двух структур DB с РНК-взаимодействиями в геноме DENV, первоначально предсказанные (Shurtleff et al., 2001; Olsthoorn, Bol, 2001), а затем экспериментально подтвержденные (Villordo et al., 2015; Chapman et al., 2014; Sztuba-Solinska et al., 2013). Также подтвердилась идея о том, что оба элемента DB действуют как энхансеры репликации DENV (Alvarez et al., 2005; Manzano et al., 2011). Было обнаружено, что DB2 содержит

структурные элементы, регулирующие репликацию вирусов за счет регуляции циклизации генома.

Важно отметить наличие консервативной последовательности (CS2), которая присутствует в обеих DB (Olsthoorn, Vol, 2001). Возможно, такая архитектура вокруг CS2 важна для обеспечения активности флавивирусов при инфекциях комаров и клеток человека.

Геном флавивирусов функционирует как динамическая молекула и изменения равновесия между линейной и кольцевой формами вирусной РНК необходимы для того, чтобы иметь большое влияние на инфекционность (Alvarez et al., 2005; Alvarez et al., 2008; Villordo et al., 2010; Friebe et al., 2011). Ряд функциональных РНК структур, существующие в линейной форме генома, перекрываются с элементами циклизации (например, sHP, 3'SL, SLB и DB) и тем самым обеспечивается контроль конформаций вирусной РНК во время вирусной репликации. Регуляция конформаций генома также может влиять на эффективность вирусной трансляции. Фактически, мутации обеих DB умеренно снижает трансляцию (Manzano et al., 2011). Однако потребуются дополнительные исследования, чтобы понять возможное участие элементов DB и конформации генома на ранних стадиях заражения, в таких процессах, как удаление оболочки и трансляция. Вероятно, в этом участвуют клеточные или вирусные белки с активностью РНК-геликазы или шаперона, а также модулируют конформацию вирусного генома. Сообщалось, что клеточные белки некоторых млекопитающих являются кандидатами на модуляцию вирусных структур РНК (Ward et al., 2011; Friedrich et al., 2018; Bidet et al., 2014). В частности, клеточная DEAD-box-РНК-геликаза, известная как DDX6, продемонстрировала специфическое взаимодействие с элементами DB, но важность этого взаимодействия требует дальнейших исследований (Ward et al., 2011). Интересно, что чувствительность к изменениям равновесия между кольцевыми и линейными формами генома DENV оказалась разной для жизнеспособности флавивируса в инфицированных клетках комаров или человека. Мутации, смещающие это равновесие, были толерантны к репликации в клетках человека и были негативными для клеток комаров (de Vorba

et al., 2015; Villordo, Gamarnik, 2013). DB мутации, которые влияют на репликацию вируса в комарах, но не влияют на репликацию вируса в клетках человека, могут быть связаны с разными требованиями тонкой настройки репликации генома.

Важно отметить, что вариации флавивирусой 3'-НТО могут так же быть вызваны селективным давлением на РНК-интерференцию (RNAi) в клетках беспозвоночных. Исследования с использованием WNV ранее показали диверсификацию вирусного генома за счет механизма RNAi у москитов (Brackney et al., 2009). Структура DB2 была мишенью при подавлении вирусной инфекции вызванной флавивирусами (Durbin et al., 2001; Shan et al., 2017). Надо заметить, что полное удаление DB2 приводило к увеличению репликационной способности вируса в клетках комаров. Одно из возможных объяснений заключается в том, что частичная делеция DB2 приводит к неправильной укладке РНК или к структурным перестройкам, которые не происходят, когда удаляется вся структура (Proutski et al., 1999). Это также может объяснить снижение количества sfRNA в инфицированных клетках комаров с помощью DENV delta30, что согласуется с недавними наблюдениями на клетках человека (Bustos-Arriaga et al., 2018).

Удаление обоих элементов DB приводило к элиминации вируса в клетках комаров и человека, а удаление только DB2 увеличивало эффективность заражения комаров, как предполагают за счет наличия двух копий этих структур РНК. Это вирусная стратегия обеспечения функциональности одного консервативного элемента, в то время как другой находится под различным селективным давлением хозяина. Большинство флавивирусов содержат дубликаты элементов DB в своих 3'-НТО. Однако РНК структуры, содержащие консервативные элементы DB, также встречаются у флавивирусов, для которых нет подтвержденных данных, или не известны вектора, такие как вирус Йокоса, вирус летучих мышей Энтеббе, Модок вирус и в специфичных только для насекомых флавивирусах, таких как вирус Чаоян и вирус Нхумирим (Villordo et al., 2016). Эти вирусы инфицируют клетки позвоночных или беспозвоночных, не

имеют возможности переключаться между хозяевами. Интересно, что единичные копии структур DB находятся в их 3'-НТО. Эта тенденция поддерживает идею о том, что дублированные DB необходимы для флавивирусов с несколькими хозяевами.

Механизмы, с помощью которых две пары дублированных элементов РНК (SL и DB) участвуют в цикле передачи вируса, по-видимому, разные, однако оба находятся под специфическим селективным давлением хозяина. Дубликации структур РНК вирусной 3'-НТО имеют отношение к адаптации хозяина и в других арбовирусах. Так, для вируса Чикунгунья описана модификация структуры вирусной 3'-НТО при адаптации к различным хозяевам (Chen et al., 2013). В этом случае дублирование прямого повтора (DR) в 3'-НТО вируса Чикунгунья оказалась полезной для репликации вируса в клетках комаров, но не используется в клетках человека.

Полученные данные для различных вирусов, переносимых членистоногими, предполагают наличие конвергентных эволюционных механизмов, связывающих дубликации структуры РНК с адаптацией к хозяину. Таким образом, полученные данные позволяют по-новому взглянуть на функции и особенности хозяина и потребности в дублированных структурах РНК в геномах флавивирусов. Понимание механизмов, которые позволяют этим вирусам реплицироваться на нескольких хозяевах, помогают, в том числе, выяснить факторы определяющие географическое распространение этих важных вирусных возбудителей.

### **1.10 Молекулярные основы вирулентности ВКЭ**

Нейроинвазивность характеризует свойство вируса реплицироваться в периферических тканях и индуцировать вирусемию в центральной нервной системе (ЦНС) путем проникновения через гематоэнцефалический барьер, а нейровирулентность обозначает способность инициировать цитопатическую инфекцию в ЦНС и вызывать энцефалит (McMinn, 1997). В целом, наиболее патогенными и нейровирулентными являются штаммы дальневосточного генотипа ВКЭ, наименее патогенными при значительно более низкой

нейровирулентности являются штаммы европейского генотипа. Сибирский генотип занимает промежуточное положение (Вотьяков и др., 2002).

Значительная разница в нуклеотидных и аминокислотных последовательностях для изолятов различных генотипов и небольшая выборка полноразмерных последовательностей геномов ВКЭ, а также плохо изученные биологические свойства этих штаммов не дают возможности однозначно установить конкретные нуклеотидные замены (или комплекс таковых), радикально влияющие на варьирование биологических свойств.

В пределах одного генотипа штаммы ВКЭ также разнятся по нейровирулентности и патогенности. Например, при экспериментальном заражении мышей штаммами ВКЭ европейского генотипа, штамм Нург оказался наиболее вирулентным, чем штамм Neudoerfl (Mandl et al., 1997), а среди вирусов дальневосточного генотипа, кроме высоковирулентного штамма Софьин, показано существование ряда менее вирулентных штаммов, отличающихся также нейровирулентностью между собой. Например, для мышей штаммы Oshima 5-10 и Хабаровск 98-10 более патогенны, чем штаммы Oshima I-1 и Хабаровск 98-5 (Hayasaka et al., 1999).

Наличие различий в развитии манифестной инфекции у различных штаммов проявляется не только количественно, но и качественно. В работе Г.Н. Леоновой с соавторами (Леонова и др., 1995) было показано, что штамм ВКЭ Пищелкин (дальневосточного генотипа), изолированный из мозга человека умершего от клещевого энцефалита, и другой штамм – ВКЭ 155 (также дальневосточного генотипа), изолированный из клещей *I. persulcatus*, являются высоковирулентными для модели новорожденных белых мышей, но на экспериментальной модели золотистых хомячков вызывают патологический процесс различного характера. Вирус штамма Пищелкин проявил себя по всем показателям как типичный нейровирулентный штамм, который, репродуцируясь в первую очередь в ЦНС, 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 ВКЭ 155 вызывал два подъема титра вируса в мозге и в крови животных, что можно трактовать как двухволновое течение инфекции. Несмотря на внутримозговой способ заражения мышей, 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 сосудистые нарушения с выраженным отеком мозга при относительной сохранности нейронов. Такое течение инфекции, вызванное штаммом 155 ВКЭ, может рассматриваться как вирусный нейроиммунопатологический процесс (Леонова и др., 1995).

Изменение нейровирулентных свойств ВКЭ иногда происходит в процессе пассирования вируса на восприимчивых животных. На примере штамма ВКЭ 205 было показано (Карпова и др., 1995), что после пассирования вируса на высокочувствительных животных, не происходит изменений его инфекционной активности для культур клеток и не изменяется его нейровирулентность 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 моноклональных антител выявлены антигенные различия в двух эпитопах белка Е и в двух эпитопах белка NS3 вариантов штамма 205 до и после 20 пассажей на мышах (Карпова и др., 1995). После проведения 7 пассажей штамма 4387 ВКЭ через *I. ricinus* наблюдали персистентную инфекцию у мышей, вместо активной репликативной инфекции исходного штамма вируса до пассирования (Labuda et al., 1994). Как отмечается авторами, снижение вирулентности ВКЭ в процессе пассирования произошло с изменением всего одного аминокислотного остатка в белке Е вируса. Впрочем, дополнительные замещения аминокислотных остатков, кодируемых другими частями вирусного генома, авторами не исключаются.

Было показано (Holzmann et al., 1997), что аминокислотные замены  $Y_{384} \rightarrow H$  и  $G_{368} \rightarrow A$  домена III белка Е ВКЭ ассоциируются с потерей нейроинвазивности на

мышинной модели инфекции клещевого энцефалита. Замена в позиции 368 белка E ВКЭ, по-видимому, приводит к изменению конформационной подвижности белковой молекулы при изменении рН.

Влияние замен отдельных аминокислотных остатков на поверхности белка E на свойства ВКЭ было исследовано методом сайт-направленного мутагенеза (Mandl et al., 2000). Так, четыре аминокислотных остатка (поз. 308–311), пространственно локализованные на боковой поверхности домена III белка E, являются частью предполагаемого центра связывания с клеточными рецепторами для флавивирусов. Авторами были сконструированы мутанты вируса, содержащие одиночные замены а.о., а также комбинации таких замен и проведен анализ вирулентности мутантов на мышах, их свойств на культуре клеток и их генетической стабильности. Наиболее значительная аттенуация вируса достигалась мутацией T<sub>310</sub>→K. Комбинация этой мутации с делецией в 3'-нетранслируемом регионе генома дает значительный урожай вирионов аттенуированного штамма. Биологический эффект мутации K<sub>310</sub>, однако, мог быть в значительной мере утерян мутацией в соседнем положении (K<sub>311</sub>→G), которая появляется спонтанно при инфицировании мышей мутантным вирусом. Мутации в других позициях а.о. также показывают важность а.о. D<sub>308</sub> и его взаимодействия с зарядами а.о. 311. В то же время а.о. 309 мог быть замещен или утерян без заметных биологических последствий. При этом делеция а.о. 309 сопровождалась спонтанной мутацией F<sub>332</sub>→Y, которая на трехмерной структурной модели белка E пространственно соседствует с а.о. 309. По мнению авторов, процессы уменьшения нейровирулентности ВКЭ, прежде всего, ассоциированы с нарушениями в ранних этапах связывания вируса с нейроном и слияния клеточной и вирусной мембран.

Значимыми в отношении биологических свойств являются также нетранслируемые последовательности генома ВКЭ, образующие вторичные структуры и выступающие в роли регуляторных элементов для транскрипции и трансляции в клетках как членистоногих, так и теплокровных хозяев. 5'-НТО служит регуляторным элементом для трансляции, обеспечивает узнавание

стартового кодона рибосомами клеток различного видового происхождения и запускает синтез вирусных белков в различных типах клеток. Это подтверждается данными показывающими, что делеции в 5'-НТО вируса Денге могут приводить к сужению круга клеток-хозяев (Саhour et al., 1995), а мутации в 5'-НТО ВКЭ могут приводить к потере жизнеспособности вируса (Khromykh et al., 2003).

Рассчитанная вторичная структура нуклеотидной последовательности 5'-НТО и прилегающего гена белка С флавивирусов состоит из: Y-структуры (фрагменты А1: 4-16 н., А2: 91-104 н., В1: 20-29 н., В2: 36-45 н., С1: 46-65 н., С2: 69-75 н.), двух комплементарных инвертированных повторов, ответственных за циклизацию генома ВКЭ (CS А: 110-128 н. и CS В: 164-175 н.) и сайта начала трансляции полипротеина AUG (133-135н.) (Mandl et al., 1993, Khromykh et al., 2001, Korenberg et al., 1999).

Недавно было установлено, что последовательности CS А и CS В, комплементарные аналогичным последовательностям в 3'-НТО, служат для циклизации генома флавивирусов и образования структуры «сковороды с ручкой», где «сковородой» является геном вируса, а «ручкой» - спаренные 5' и 3'-НТО (Gritsun and Gould, 2007b).

Для вируса Денге было показано, что некоторые мутации в областях CS А и CS В блокируют репликацию вируса, несмотря на сохраненную возможность к образованию комплементарных циклических структур, что свидетельствует о важности этих элементов в процессе репликации вирусной РНК (Alvarez et al., 2008).

Исследования генетического разнообразия ВКЭ, проведенные в европейской части ареала (Casati et al., 2006) показывают высокую гетерогенность 5'-НТО геномной РНК (55,5%), причем в некоторых случаях имеет место смещение рамки трансляции вирусного полипротеина до 20 н.о. за счет изменения длины 5'-НТО. Эти данные свидетельствуют о важности 5'-нетранслируемой области не только в плане влияния замен в ней на процессы трансляции, но и как индикатора эволюции ВКЭ.

В другой работе (Hayasaka et al., 2004), было проведено сравнение нейровирулентности исходного штамма Oshima 5-10, его производного, несущего ряд замен ( $S_{40} \rightarrow P$  в белке E,  $V_{378} \rightarrow A$ ,  $R_{674} \rightarrow K$ ,  $T_{794} \rightarrow A$  в белке NS5,  $G_{10473} \rightarrow A$ ,  $A_{10922} \rightarrow G$  в 3'-нетранслируемой области), и клонов с различными комбинациями этих замен. На мышинной модели было показано, что значимыми для нейроинвазивности и нейровирулентности являются мутации  $S_{40} \rightarrow P$ ,  $V_{378} \rightarrow A$ ,  $R_{674} \rightarrow K$ . При сравнении кривых роста ВКЭ на культуре клеток ВНК, значимой оказалась лишь мутация  $S_{40} \rightarrow P$ . Необходимо отметить, что полностью реконструированный клон, не несущий замен сравнительно с исходным штаммом, все же уступал ему в нейроинвазивности, нейровирулентности и скорости роста, что связывается авторами с существованием исходного штамма в форме квазивида (смеси близкородственных геновариантов).

О такой гетерогенности говорят и другие исследователи (Леонова, 1997), а в отдельных случаях обнаруживается даже сосуществование в одном клеще различных генотипов ВКЭ (Карань и др., 2007).

В популяциях ВКЭ в процессе циркуляции по цепи клещи – животные прокормители – клещи, постепенно закрепляются такие мутации в геноме, которые лучше соответствуют условиям существования вируса в организмах как клещей, так и их прокормителей или тех и других попеременно. При этом, каждый конкретный штамм, в действительности, представляет собой смесь различных мутантов, из которых те или иные имеют преимущество в репликации в соответствии с видом хозяина. Одним из процессов, обуславливающим быстрое кажущееся изменение свойств при многократных пассажах на мышах или клещах, на самом деле является быстрый отбор мутантов из квазивидовой популяции. Кроме того, в наиболее важных участках генома ВКЭ, в ходе эволюции вируса, формируются протяженные устойчивые фрагменты с характерными последовательностями нуклеотидов, отражающие соответствующие особенности природных условий (круг хозяев) длительного существования ВКЭ в пределах региона в целом, чем и обусловлено возникновение генотипов ВКЭ. При этом, вместе с возникновением стабильных генотип-характерных последовательностей

в составе генов происходит и появление других дополнительных мутаций, ведущих к появлению и селекции многочисленных штаммов вируса, отражающих разнообразие локальных особенностей природных условий. Постепенное изменение местных условий существования вируса в изолированном эпидочаге, со временем способствует закреплению новых мутаций в нуклеотидной последовательности и приводит к отбору, и накоплению новых штаммов вируса, лучше приспособленных к данным условиям. Так как изменение нейроинвазивных, нейровирулентных свойств и общей вирулентности ВКЭ связано подчас с появлением единичных или кластерных нуклеотидных мутаций в различных частях генома, то следует ожидать, что штаммы вируса одного генотипа между собой могут проявлять гетерогенность вышеуказанных свойств.

### **1.11 Популяция вируса и смена хозяев**

Возникающие вирусные заболевания, как правило, являются результатом смены хозяина, когда вирус «перескакивает» от своего бывшего хозяина к новому. Смена хозяина – частое событие в эволюции большинства патогенов, но как реализуется механизм, позволяющий патогенам успешно менять хозяев различных видов, остается неясно. Восприимчивость к патогену у потенциальных новых хозяев может сильно отличаться от естественного хозяина. Как правило, естественный хозяин является наиболее восприимчивым к данному патогену, поэтому патогены должны адаптироваться, чтобы успешно заразить нового хозяина, например, использовать другие клеточные рецепторы, возможность избегать иммунного ответа и др. К счастью, вирусы ограничены в молекулярных решениях для достижения этого, и поэтому, когда вирус заражает основного хозяина, часто отмечаются одни и те же изменения в нуклеотидной последовательности генома патогена. Как правило, эти изменения могут приводить к изменению адаптивных возможностей патогена, а это иногда может предотвратить дальнейшую смену хозяина.

Если у патогена отсутствует необходимый механизм адаптации к новому виду хозяина, это может привести к угасанию инфекции или сформировать короткую

цепь передачи. Примерами эффективной смены хозяев вирусами, приведшей к множественным человеческим пандемиям, являются такие, как передача ВИЧ человеку от шимпанзе (Sharp, Hahn, 2010), или вируса гриппа H1N1 - "Испанский грипп" от птиц (Webby, Webster, 2001).

Другими важными для человека патогенами произошедшими от других видов хозяев являются *Plasmodium falciparum* (Liu et al., 2010), коронавирус SARS (Li et al., 2005; The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team, 2020; Hui et al., 2020), вирусы Hendra и Nipah (Chua et al., 2000), вирус кори (Furuse et al., 2010).

Именно поэтому, большой интерес представляют механизмы, которые влияют на способность возбудителя заразить нового хозяина, способность патогена адаптироваться, чтобы эффективно передаваться и длительно персистировать. Чрезвычайно важно картировать те изменения в геноме патогена, отбор которых будет способствовать закреплению мутаций, которые позволяют патогену эффективно войти в клетку-хозяина и точно оптимизировать репликацию патогена в новых условиях.

РНК-вирусы являются наиболее интересной группой патогенов, у которых эффективно происходит смена хозяев, возможно, из-за их способности быстро адаптироваться (Davies, Pedersen, 2008; Woolhouse et al., 2005).

РНК-вирусы склонны к смене хозяев принадлежащих отдаленным родственным видам (Davies, Pedersen, 2008; Woolhouse et al., 2005). Наличие подходящих клеточных поверхностных рецепторов, позволяющих вирусам проникать в клетки, может быть причиной эффективной смены хозяина. Например, способность вируса птичьего гриппа инфицировать хозяина, по крайней мере, определяется наличием внутри клеток альфа 2,3-связанных рецепторов сиаловой кислоты хозяина (Shinya et al., 2006).

Если конкретные мутации необходимы для выживания у нового хозяина, то высокая частота мутаций может быть особенно выгодна (Loverdo, Lloyd-Smith, 2013). При высокой частоте мутаций, большинство из них являются не эффективными или даже летальными (Sanjuan et al., 2010), поэтому шансы на

смену хозяина будут максимальными при промежуточной частоте мутаций (Loverdo, Lloyd-Smith, 2013). В то же время известно, что доля мутаций, которые являются вредными в прежнем хозяине, может быть уменьшена в новом хозяине (Lalic et al., 2011). Поэтому, можно предположить, что высокие показатели мутаций объясняют почему РНК-вирусы часто «прыгают» между видами.

Конечно, вирусным патогенам, чтобы успешно инфицировать, необходимо достаточно быстро адаптироваться к смене хозяина, но с другой стороны, эффективная смена хозяина зависит от вероятности того, что необходимый набор мутаций может заранее накапливаться в вирусной популяции. Соответственно, высокая скорость мутаций РНК вирусов может объясняться тем, что необходимый набор мутаций уже накоплен в вирусной популяции (Woolhouse et al., 2005).

Если при адаптации к новому хозяину возникает несколько мутаций, то очень важно, чтобы мутации были компенсаторными. Например, было несколько вспышек лихорадки Чикунгунья связанных с передачей вируса преимущественно от *Aedes albopictus*, а не от *Aedes aegypti*. Единственное изменение, приведшее к этому событию, была аминокислотная замена позволившая адаптироваться вирусу к новому вектору (Tsetsarkin et al., 2011). И, несмотря на то, что *A. albopictus* широко распространен в Азии, эта мутация не проявляла себя в популяции. Когда же произошла вспышка лихорадки Чикунгунья, то вирус оказался африканского происхождения. В данном случае, мутация в африканском вирусе оказала влияние на распространение азиатских штаммов в новом векторе, обусловленное эпистатическим взаимодействием с новым хозяином (Tsetsarkin et al., 2011).

В некоторых вирусах часто встречаются одни и те же параллельные мутации, возникающие каждый раз, когда вирус приспосабливается к определенному виду хозяина (Remold et al., 2008; Wichman et al., 1999), что свидетельствует об ограничениях в молекулярном решении приспособления вируса для заражения нового вида хозяина (мутационная мишень, т.е. чем больше параллельных изменений наблюдается, тем меньше степень свободы). Это может означать, что

для вируса существует ограничение в выборе хозяина за счет отсутствия необходимых адаптивных мутаций.

Размер мутационной мишени наиболее изучен у фагов, где адаптация к хозяину может быть параллельной, так что одни и те же мутации становятся фиксированными в независимых популяциях (Wichman et al., 1999). Важность этих мутаций иллюстрируется экспериментами, которые "перематывают эволюционную ленту" путем адаптации фагов от новых хозяев к первоначальному хозяину и наблюдают реверсию мутации в обратном порядке (Crill et al., 2000). Параллельная эволюция на молекулярном уровне также существует и у эукариот. Это было показано в экспериментах с вирусом везикулярного стоматита, который культивировали в клетках человека и собаки – мутации происходили параллельно, как правило, в одних и тех же типах клеток (Remold et al., 2008).

Параллельные мутации часто позволяют обойти критический барьер на пути вируса для успешной передачи новому хозяину. И хотя мы все больше понимаем генетические механизмы, которые лежат в основе смены хозяина, по-прежнему без ответа остаются многие важные вопросы. Например, появление мутаций при смене хозяина происходят как мутации *de novo* в новом хозяине или как результат отбора оптимального варианта из гетерогенной популяции? Каким образом соблюдается компромисс между производительностью вируса и мутационной изменчивостью позволяющей произвести смену хозяина? Как возникают мутации, чем определяется размер мутационной мишени и что является барьером для смены хозяина? Например, мутационные цели кажутся маленькими для относительно простых признаков, таких как изменения необходимые для использования различных рецепторов, но могут быть большими для сложных признаков, таких как вирулентность.

Одним из малоизученных последствий смены хозяина является то, как это влияет на распределение патогенных микроорганизмов по видам хозяев (Engelstadter, Hurst, 2006). Число и тип патогенных микроорганизмов, инфицирующих хозяина, частично является результатом «приобретения» уже после смены хозяина (Waxman et al., 2014).

Изучая молекулярные механизмы смены хозяев можно раскрыть эволюционные процессы, которые влияют на появление новых и вновь возникающих инфекций.

### **1.12 Заключение**

В настоящее время, переносимые клещами инфекции являются актуальной проблемой для здравоохранения, как в Российской Федерации, так и во всем мире. Наличие широкого спектра переносимых клещами патогенов, клинические проявления которых ранее приписывались исключительно ВКЭ, делает необходимым развитие дифференциальной диагностики проб от больных, а также изучения спектра переносимых клещами патогенов в природных очагах в каждом регионе страны (Злобин и др., 2007). Этим и обоснован выбор одной из целей нашей работы – изучение встречаемости и генетического разнообразия инфекций, переносимых клещами в природных очагах.

ВКЭ, как наиболее опасный по последствиям патоген, переносимый клещами, заслуживает более подробного изучения как в плане уточнения ареалов распространения генотипов, так и в плане увеличения суммы знаний о молекулярных основах его патогенности. 5'-НТО ВКЭ представляет в этом отношении особый интерес, поскольку является весьма существенной для репликации областью генома вируса. Исследование 5'-НТО природных вариантов ВКЭ европейского генотипа, проведенное в Швейцарии, показало значительную вариабельность данной области генома (Casati et al., 2006). Для вариантов ВКЭ сибирского и дальневосточного генотипов подобных данных в настоящее время в литературе не опубликовано.

На сегодняшний день в литературе опубликовано более 150 полных последовательностей геномов различных штаммов ВКЭ. Большинство из них было выделено несколько десятков лет тому назад, и многократно пассировались на различных культурах клеток, тканях и животных. В виду этого, штаммы могут значительно отличаться от существующих в настоящее время природных изолятов. Для проведения адекватного филогенетического анализа, вычисления

хода молекулярных часов и прочих расчетов, очевидно, необходимо определение полных нуклеотидных последовательностей первичных природных изолятов или минимально пассированных штаммов ВКЭ. Подробное изучение нуклеотидных и аминокислотных замещений в ВКЭ в процессе формирования лабораторного штамма, несомненно, позволило бы нам получить новую информацию о молекулярных основах адаптации ВКЭ при смене хозяина.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Химические реагенты, ферменты и наборы

В работе были использованы следующие материалы:

- реагенты производства ЗАО "Лаверна" (Россия) категории о.х.ч.: соляная кислота, гидроксид натрия, этиловый спирт, ледяная уксусная кислота;
- реагенты производства "Sigma" (США): агароза, бромид этидия, трис (гидрокси метил) аминометан (Трис), Трис-НСl, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), ацетат натрия;
- набор для выделения ДНК/РНК "АмплиПрайм Рибо-преп" производства ЦНИИ Эпидемиологии (Россия);
- набор для получения кДНК на матрице РНК "Реверта-L" производства ЦНИИ Эпидемиологии (Россия);
- реагент для выделения суммарной РНК "ExtractRNA" – монофазный водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата, «Евроген» (Россия);
- набор MMLVRT для синтеза кДНК на матрице РНК, "Евроген" (Россия);
- набор для амплификации "БиоМастер LRHS-ПЦР", "BioLabMix" (Россия);
- набор "diaGene" для элюирования продуктов амплификации из агарозного геля, "Диа-М" (Россия);
- нуклеотидные последовательности продуктов амплификации определяли по методу Сенгера с помощью автоматического генетического анализатора ABI 3130xl ("Applied Biosystems", США) и набора реагентов BigDye Terminatorv 3.1 Cycle Sequencing Kit ("Applied Biosystems") в соответствии с инструкциями производителя;
- олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в Исследовательском центре "Вектор" (Кольцово) и очищены методом жидкостной хроматографии.

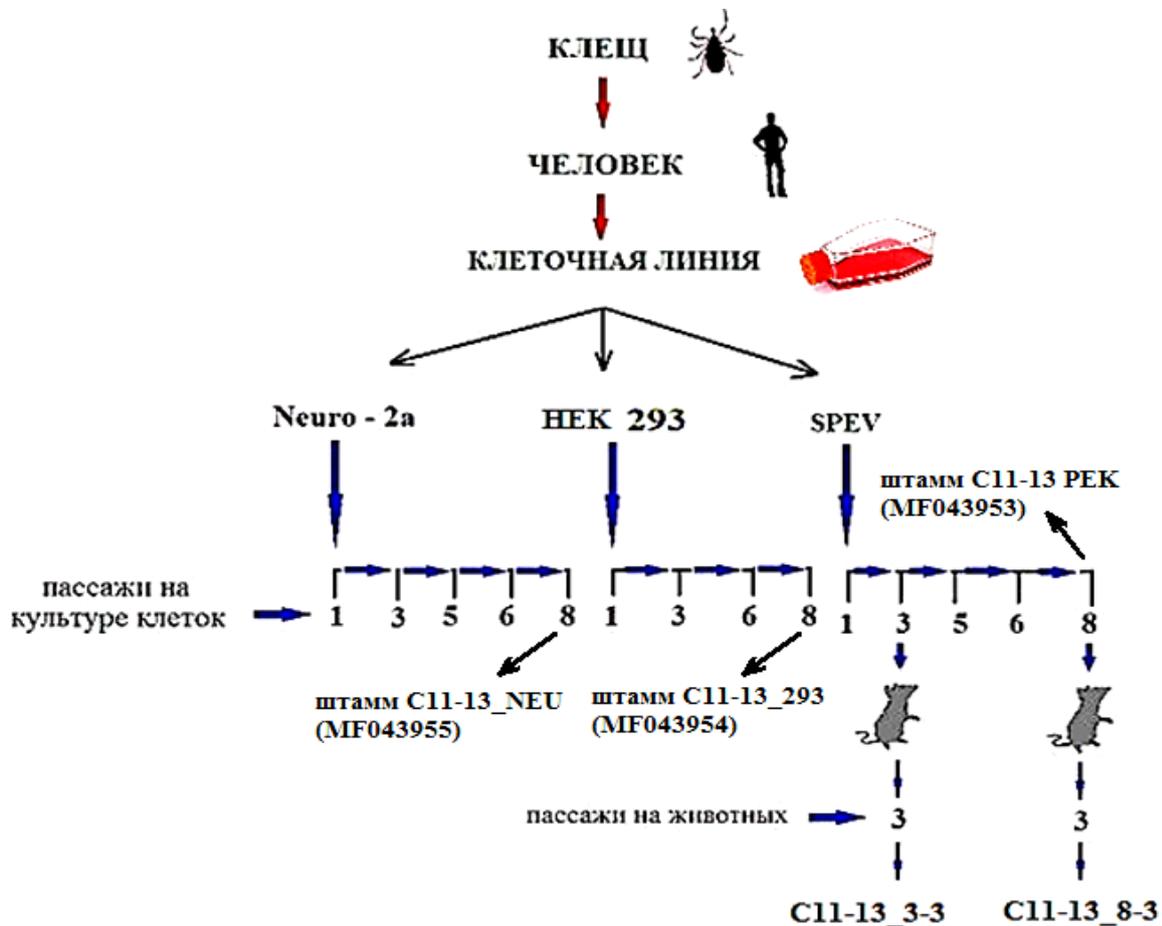
### 2.2 Вирусы, используемые в работе

Вирусы клещевого энцефалита:

**2.2.1** Штаммы: Absettarov, Kolarovo-2008, Tomsk-PT 122, Zausaev, Vasilchenko, Lesopark-11, Buzuuchuk, Glubinnoe/2004, 4072, 205, Sofjin, Tomsk PT-12, Tomsk

PT-14, Tomsk-M202, Tomsk-M83, Tomsk K6, Novosibirsk-L2008 и 886-84 были получены из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и перед определением полногеномной последовательности культивировались на клетках SPEV.

**2.2.2** Штамм С11-13, выделенный в 2013 году из мозговой суспензии человека, умершего от клещевой инфекции в Мошковском районе Новосибирской области (рисунок 2.1). На проведение исследований образцов человеческого мозга было получено этическое разрешение от Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Приказ № 88 от 17.03.2008 г.), а также соблюдены правила по кодированию образцов человека.



**Рисунок 2.1.** Схема последовательных пассажей (1 – 8 пассажей) ВКЭ С11-13 на культурах клеток SPEV, Neuro-2a и HEK 293, а также три пассажа на животных.

Штамм прошел серию последовательных пассажей на клетках SPEV, Neuro-2a и НЕК 293. В результате исследования был получен набор реплицирующихся с разной эффективностью вариантов ВКЭ (GenBank C11-13 РЕК MF043953, C11-13-293 MF043954, C11-13-NEU MF043955) (рисунок 2.1). После 1, 3, 5, 6 и 8 пассажей на культурах клеток определяли титр вируса и нуклеотидную последовательность вирусной геномной РНК.

При адаптации (три пассажа) к мелким млекопитающим (мышам) получены варианты ВКЭ – C11-13\_3-3 и C11-13\_8-3

### 2.2.3 Природные изоляты были выделены из клещей:

– 591 имаго *I. persulcatus*, собранных в 2014-2015 гг. в Новосибирской области, в районе села Бурмистрово, в городских биотопах Томска, Екатеринбурга и Владивостока, в южных и центральных районах Республики Коми, в Алтайском крае;

– 189 имаго (самцов и самок) клещей *I. ricinus*, *Dermacentor spp.* и *Haemaphysalis spp.*, собранных в период с 2010 по 2011 год в восьми районах (Ungheni, Chisinau, Vadul-lui-Voda, Strasheni, Comrat, Orhei, Drochia and Glodeni) Республики Молдова.

Места для сбора были выбраны в типичных местах обитания клещей: лиственные и смешанные леса с хорошо развитым травянистым покровом, вырубки с естественным возобновлением лиственных пород, луга, обочины дорог. В черте города клещей отлавливали в парковых зонах. Сбор клещей проводился методом отлова "на флаг" во второй половине дня, когда наблюдается максимальная активность иксодовых клещей. Клещей перевозили на влажной салфетке в сумках-холодильниках при температуре +4°C и хранили при температуре минус 18 – 24°C. Для определения вида клеща был секвенирован фрагмент 16S рРНК, кодируемой митохондриальным геномом.

## 2.3 Культуры клеток

Клеточные линии – SPEV, Neuro-2a и НЕК 293 были получены из банка клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" и поддерживались на среде DMEM, содержащей 10% сыворотки плода коровы и 80 мкг/мл сульфата гентамицина.

#### **2.4 Животные**

Все процедуры с животными проводились в соответствии с действующими документами "Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных" (<https://docs.cntd.ru/document/456016716>) и "Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных" (Washington, 1996), а также в соответствии с Протоколом № 1-01.2014, утвержденным биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора 28 января 2014 года.

В эксперименте использовались 2 – 3 дневные сосунки беспородных мышей обоего пола массой 2-3 г, полученные из питомника ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор". Для интрацеребрального заражения использовали вирусосодержащую культуральную среду с клеток SPEV (3 и 8 пассаж ВКЭ на SPEV, штамм С11-13) в разведении  $10^{-1}$  (см. схему выше). Вирусный материал вводили на расстоянии 1 – 2 мм от точки пересечения средней линии черепа с линией, соединяющей внешние уголки глаз. Для заражения использовали туберкулиновый шприц с тонкой иглой, объем вводимого материала составлял 10-20 мкл на сосунка. Для дальнейшего пассирования вируса на животных использовали 10%-ную мозговую суспензию мышей. Вскрытие сосунков проводили на 5-6 сутки. Определение нуклеотидных последовательностей вирусной геномной РНК проводили секвенированием после третьего пассажа на животных.

#### **2.5 Выделение и титрование ВКЭ**

Образец, содержащий вирус добавляли к монослою культуры клеток. После одного часа адсорбции при комнатной температуре монослой заливали средой с 2% сывороткой крупного рогатого скота и инкубировали при 37°C. Результаты фиксировали через 7 суток. Репликацию вируса оценивали по цитопатическому действию, характерному для ВКЭ, и методом ИФА.

## 2.6 Иммуноферментный анализ

Выявление антигена ВКЭ в культуральной среде проводили методом иммуноферментного анализа с использованием мышиных моноклональных антител против ВКЭ (10H10) в качестве субстрата в соответствии с рекомендациями (Kuno et al., 1985). Связанный антиген определяли с помощью мышиных моноклональных антител (ЕВ1), меченных биотином и стрептавидинпероксидазным конъюгатом (ICN, США).

Штаммы ВКЭ титровали на клетках с использованием 96-луночных культуральных микропланшетов. После 7 дней экспозиции при 37°C был проведен учет результатов по ЦПД.

## 2.7 Выделение суммарной РНК и синтез кДНК (обратная транскрипция)

Перед гомогенизацией всех клещей промывали один раз в 70% этаноле, а затем дважды водой, для удаления потенциальных поверхностных микроорганизмов. Клещей гомогенизировали на QIAGEN TissueLyser LT, с 300 мкл стерильного физраствора. Гомогенаты центрифугировали при 8000 g в течение 5 мин при 4 °С и супернатант отбирали для анализа. Тотальную РНК из гомогената клещей и клеточных лизатов экстрагировали с помощью «Реагент Extract RNA» (Евроген, Россия). К 1 объему гомогената (клеточного лизата) добавляли к 5 объемам однофазного водного раствора фенола и изотиоцианата гуанидина - Reagent Extract RNA ("Евроген", Россия), инкубировали при 65°C в течение 15 минут, затем добавляли 100 мл хлороформа, перемешивали и после центрифугирования при 12000 об/мин, 5 мин водную фазу (300 мкл.) переносили в чистую пробирку. Затем добавляли 300 мкл охлажденного изопропанола и 1 мкл гликогена. Образец перемешивали и центрифугировали при 14 000 об/мин 15 мин, 4°C, на центрифуге Z233МК-2 ("Hermle", Германия). Осадок РНК дважды промывали 70% этанолом.

кДНК синтезировали с рэндом-праймерами с использованием набора MMLVRT ("Eurogen", Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Синтез кДНК проводили в течение 1 ч при 37 °С.

## 2.8 Полимеразная цепная реакция

В ходе работы были приняты специальные меры для предотвращения возможного загрязнения из-за попадания продуктов ПЦР в запасы растворов или переноса материала от образца к образцу. Меры включали физическое разделение процедур с отдельными этапами работы в разных помещениях, использование разных наборов пипеток для:

- выделение РНК и проведение ОТ;
- проведение первого и второго раундов ПЦР;
- анализ продуктов амплификации.

Структуры рассчитанных праймеров, использованных для амплификации фрагментов геномов различных патогенов, приведены в таблице 2.1. Определение концентрации ДНК/РНК при исследовании проводилось с использованием флуориметра QUBIT (Invitrogen, США) и наборов реагентов "Qubit ds DNA HS Assay Kit" и "Qubit ds RNA Assay Kit" (Invitrogen, США).

Амплификацию проводили с использованием наборов "BioMasTer LRHS-PCR" ("BioLabMix", Россия) в прилагаемом буфере.

Температурные условия амплификации (амплификатор T100 или C1000 "Bio-Rad", США) для разных пар праймеров подбирали экспериментально (типичные условия: 94°C – 10 с, 58°C – 20 с, 72°C – 30 с (40 циклов), 72°C – 7 мин.

В работе использовалось лицензионное программное обеспечение Microsoft OfficePro 2007 Win32, Vector NTI Suite 11 и Lasergene 7. Подбор и анализ свойств олигонуклеотидных праймеров проводили с использованием программного обеспечения Vector NTI 11 (Informax) и Oligo6.

**Таблица 2.1 Олигонуклеотидные праймеры, использованные для определения полной нуклеотидной последовательности С11-13 ВКЭ.**

Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида, 5'→3'
1F	AGATTTTCTTGCACGTGCRTGCGTTTG
19F	TGCGTTTGCTCCGGAYAAG

240R	CCCAKCATGCGCATCAAC
551F	TGGARAATGGCACCTGTGT
557R	GCCAGIATCACACAGGTGCCAT
835R	TTCTTCCAGACCCATCCYTCAAC
1087R	GRGTCAAGCCACACITCCAT
2138F	GTCAYCAATGGTTCCAAAAAGG
2367R	TTYCTCATGTTCAGGCC
2714F	ATCTCACAGTRGTGGTGGACAA
2815R	CAGATCATTGAITGGCCCCA
3246F	AGAACAIGTGAAAGGRCCATGG
3368R	GGRATIACCTTGCCACTCTCTG
3760F	CAGGCTGTGTTTGAGYTGAGGG
3988R	CITGCTGTGTCATGAGRGCAT
4249F	CTGGCCAGCGGCATGATSCG
4249R	CGSATCATGCCGCTGGCCAG
4752F	GATGTGGCAYGTGACGAG
4755R	CYCCTCTCGTCACITGCCAC
5080F	GARACCTACGTCAGCAGCAT
5227R	TGGCGAATRAGCTCCGGGAG
5449F	TGGGARGTAGCAATCATGGA
5787R	TCACTCTGGAGTAGTCCTTTTCA
6027F	CTCTGGACAGTGTGATGA
6027R	TCATCATCACACTGTCCAGAG
6543F	CTACACRCTIATGCATGAGG
6592R	CCTCTGGRGCATCICTCTC
6916F	TTTCTGGAGAAGACYAAGGC
7075R	TTGGTCTGMAGTTGGTGIAT
7318F	GTCTTYTTCTCIGCAATGGT
7318R	ACCATTGCMGAGAAIAAGAC

7905F	TGGATGTGGAAGRGGCGGCTG
7905R	CAGCCGCCYCTTCCACATCCA
8473F	GAGGACAAGGTGAAIGAAMAAGA
8580R	GCGGTAGCTGCCCAGTAC
9091R	CTCCCIAGCCACATGTACCA
9850F	TGCCGAGACCAAGATGAACT
10736F	CGACGCAICMTCCATGAAG
10736R	CTTCATGGAIGRTGCGTCG
11118R	AGCGGGTGTTTTTCCGAGTCACWCA

## 2.9 Электрофорез и выделение продукта ПЦР из агарозы

Продукты амплификации разделяли на 2% агарозном геле в однократном буфере TAE (40 мм Трис, 1 мм Na<sub>2</sub>EDTA, уксусная кислота). Для визуализации ДНК гель окрашивали бромистым этидием (10 мг/мл). Гель исследовали на ультрафиолетовом трансиллюминаторе TCP-20 MC (Wilber Lourmat, Франция) и фотографировали с помощью системы видеодокументации KPC-650 ВН (КТ&С, Южная Корея). Для выделения продуктов амплификации из агарозного геля использовали набор «diaGene» (Диа-М, Россия).

## 2.10 Определение нуклеотидной последовательности (по методу Сэнгера)

Нуклеотидные последовательности продуктов амплификации определяли с помощью автоматического генетического анализатора ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) и набора реагентов BigDye Terminatorv 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя. Последовательность нуклеотидов определялась, не менее двух раз, в независимых экспериментах. Выравнивание нуклеотидной последовательности проводили с использованием приложения Lasergene 7 (DNASTAR) и/или Unipro UGENE. Сравнительные нуклеотидные последовательности были взяты из базы данных GenBank. Многократное выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с использованием приложения AlignX программного пакета Vector

NTI 11 (InforMax). Филогенетический анализ последовательностей штаммов и изолятов ВКЭ был проведен с использованием программы MEGA7 (Tamura et al., 2011). Экспериментально определенные последовательности были внесены в международную базу данных GenBank.

### 2.11 Определение нуклеотидной последовательности (по методу NGS)

Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием модуля NEBNext® Ultra Directional для синтеза первой цепи ДНК. Синтез второй цепи ДНК проводили с использованием UMI Second Strand Synthesis Module for QuantSeq FWD (Illumina) Lexogen. Подготовленные ДНК библиотеки анализировали на MiSeq с использованием технологии Illumina. Cutadapt (версия 1.18) и SAMtools (версия 0.1.18) использовали для удаления адаптеров Illumina и повторного чтения. Контиги были собраны de novo с использованием ассемблера MIRA (версия 4.9.6).

### 2.12 Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Для генотипирования выявленных вариантов ВКЭ был проведен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей. Для сравнения были использованы последовательности штаммов, которые представлены в таблице 2.2. Множественное сравнение последовательностей проводилось с использованием программного пакета Vector NTI 11.

**Таблица 2.2 Штаммы вирусов клещевого энцефалита.**

Штамм	Номер последовательности в базе данных GenBank	Генотип
Aina	JN003206	Сибирский
886-84	EF469662	Сибирский
EK328	DQ486861	Сибирский
Est54	GU183384	Сибирский
Latvia 1-96	GU183382	Сибирский

C11-13	KP644245	Сибирский
C11-13PEK	MF043953	Сибирский
C11-13 Neu	MF043955	Сибирский
IR 99-22f7	LC017691	Сибирский
MucAr M14-10	JQ429588	Сибирский
Kolarovo	FG968751	Сибирский
178-79	EF469661	Сибирский
Vasilchenko	AF069066	Сибирский
Zausaev	AF527415	Сибирский
Buzuuchuk	KJ626343	Сибирский
Irkutsk-12	JN0032009	Сибирский
Tomsk-PT122	KM019545	Сибирский
Tomsk- M83	KJ739731	Дальневосточный
Primorye-633	HM859594	Дальневосточный
Primorye-92	HQ201303	Дальневосточный
Tomsk-PT12	KM019546	Дальневосточный
Tomsk-K6	KJ739730	Дальневосточный
205	DQ989336	Дальневосточный
Oshima5-10	AB062063	Дальневосточный
Xinjiang-01	JX534167	Дальневосточный
Glubinnoe-2004	DQ862460	Дальневосточный
Primorye-196	JQ825155	Дальневосточный
Sofjin	JX498940	Дальневосточный
Novosibirsk-L2008	KJ739729	Дальневосточный
Tomsk-PT14	KJ914682	Дальневосточный
Tomsk-M202	KJ914683	Дальневосточный
4072	KF951037	Дальневосточный
Neudoenfl	TEU27495	Европейский
Est3476	GU183383	Европейский

Salem	FG572210	Европейский
Absettarov	KJ000002	Европейский
Hypr_IC	KP716974	Европейский
KrM93 Korea	HM535611	Европейский
Greek goat	DQ235153	Европейский
Turkish sheep	DQ235151	Европейский
Powassan virus Spassk-9	EU770575	

### 2.13 Филогенетический анализ

Анализ, при построении филогенетических деревьев в этой работе, проводился методом "объединения ближайших соседей" с использованием двухпараметрической модели Кимуры (Кимура, 1980).

Филогенетический анализ и расчет молекулярных часов были проведены с использованием программ MEGA 7 и TREE-PUZZLE (Schmidt et al., 2002). Для оценки достоверности группирования использовался тест на стандартную ошибку длин ветвей (Rzhetsky and Nei, 1992) и бутстреп-тест (1000 репликаций)(Felsenstein, 1985).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

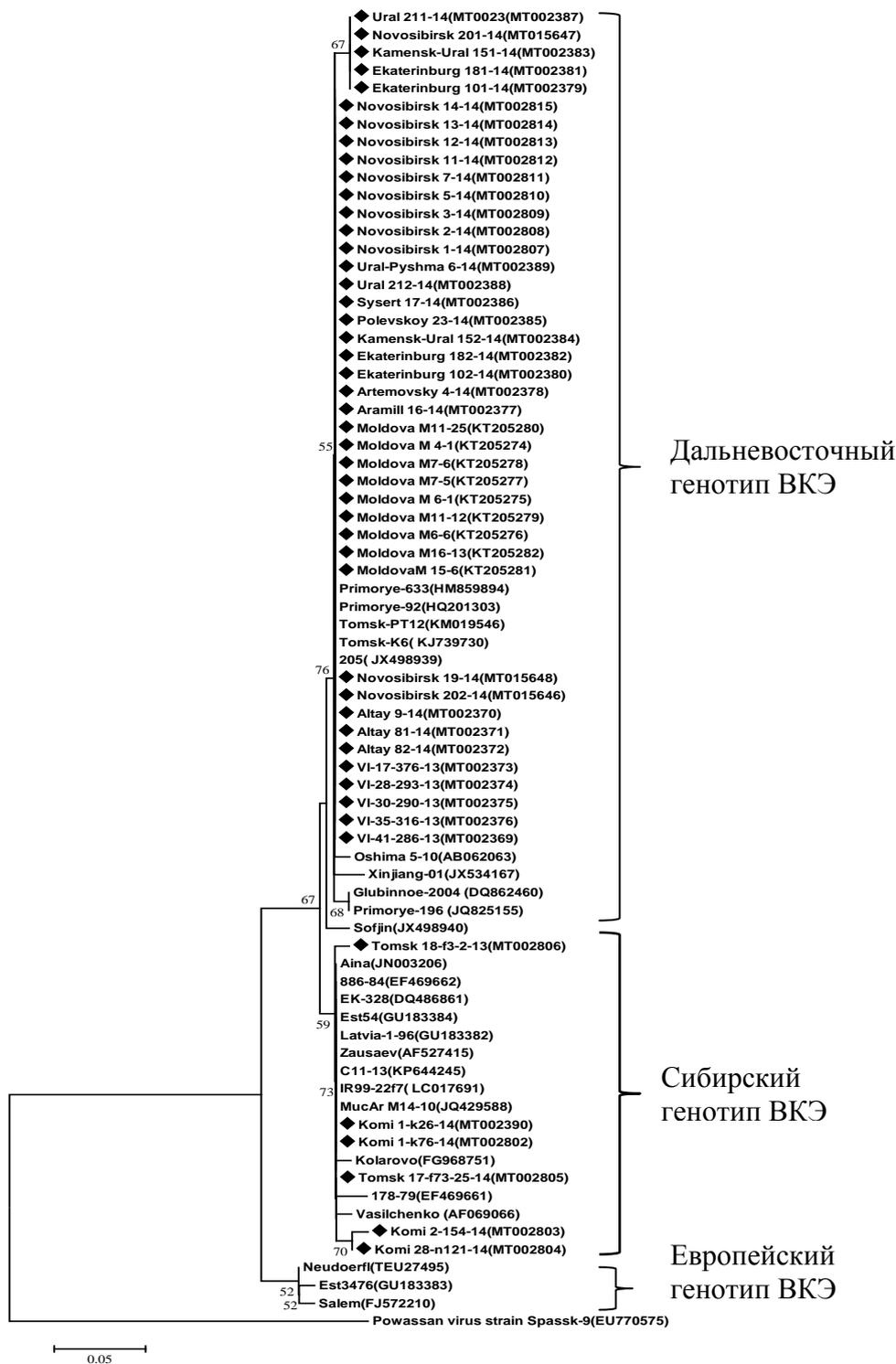
### 3.1 Изучение генетической variability 5'-нетранслируемой области генома вируса клещевого энцефалита в различных регионах Северной Евразии

В работе использовались имаго клещей *I. persulcatus*, обоих полов, собранных в 2014 – 2015 гг. в Новосибирской области, в районе с. Бурмистрово, в городских биотопах Томска и Екатеринбурга, Владивостока, в южных и центральных районах Республики Коми, в Алтайском крае. Общее количество исследованных клещей составило 591 особь. Соотношение самцов и самок было, примерно, одинаковым. Вирусная РНК обнаружена в 39 образцах клещей, что составило в среднем 6,6 %. Также были использованы 189 имаго клещей (самцов и самок) клещей *I. ricinus*, *Dermacentor spp.* и *Haemaphysalis spp.* из Республики Молдова, собранных в период с 2010 по 2011 год. Вирусная РНК выявлена в 9 образцах, что составило – 4,76 %.

Определение нуклеотидной последовательности 5'-НТО вирусного генома позволило провести генотипирование природных изолятов ВКЭ. Большинство исследованных нами образцов ВКЭ принадлежали к дальневосточному генотипу (прототипный штамм – 205) и только образцы из Республики Коми и Томска группировались с известными геновариантами сибирского генотипа ВКЭ (прототипный штамм – Заусаев), однако не были полностью им идентичны (рисунок 3.1). Средний уровень идентичности 5'-НТО ВКЭ у отдельных клещей составил 95 % для дальневосточного и 89 % для сибирского генотипа ВКЭ в сравнении с прототипными штаммами.

Сравнение нуклеотидных последовательностей 5'-НТО ВКЭ показало, что наблюдаются замены с характерным паттерном для сибирского и дальневосточного генотипов ВКЭ. Анализ относительно короткого фрагмента (181н.) генома, выявил выраженную изменчивость нуклеотидной последовательности 5'-НТО ВКЭ у лабораторных штаммов и природных изолятов ВКЭ. Количество замен достигало 17 – 22 (см. приложение 1) для дальневосточных вариантов и 16 – 19 замен (см. приложение 1) для сибирского

генотипа, в сравнении с прототипными лабораторными штаммами ВКЭ (205 и Заусаев).



**Рисунок 3.1** Филогенетическое дерево, построенное для нуклеотидных последовательностей 5'-НТО ВКЭ, выделенных из индивидуальных таежных клещей. Дополнено 9 последовательностями 5'-НТО ВКЭ из клещей, собранных

ранее в Республике Молдова. ◆ – секвенированные последовательности 5'-НТО ВКЭ. Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-х параметрической модели Кимуры.

При оценке различий в НТО у различных генотипов ВКЭ, можно отметить то, что наблюдаемые генетические отличия были крайне неравномерно распределены по основным элементам 5'-НТО ВКЭ. Так, при анализе нуклеотидной последовательности 5'-НТО дальневосточных и сибирских изолятов было обнаружено, что В2, С1, С2 элементы Y-образной структуры 5'-НТО (таблица 3.1) содержали множественные нуклеотидные замены. В элементах В2, С1, С2 5'-НТО ВКЭ у природных вариантов было выявлено от 4 до 10 замен и от 3 до 12 замен для лабораторно культивируемых штаммов ВКЭ. Вне основных элементов 5'-НТО было обнаружено 8 замен у природных вариантов ВКЭ и 19 замен у лабораторно культивируемых штаммов. Полученные данные позволили отнести В2, С1, С2 элементы Y-образной структуры 5'-НТО, а также районы вне основных элементов к переменным последовательностям 5'-НТО (таблица 3.1).

**Таблица 3.1 Распределение количества нуклеотидных замен в основных элементах 5'-НТО ВКЭ**

Элементы 5'-НТО ВКЭ	Общее количество обнаруженных нуклеотидных замен в изолятах и лабораторных штаммах в сравнении с прототипными штаммами ВКЭ.			
	Штамм Заусаев / последовательности клещевых изолятов ВКЭ*	Штамм 205 / последовательности клещевых изолятов ВКЭ*	Штамм Заусаев / лабораторные штаммы ВКЭ**	Штамм 205 / лабораторные штаммы ВКЭ**
Консервативные элементы 5'-НТО ВКЭ				
A2	0	0	1	1
CS A	0	0	0	0
ATG	0	0	0	0
CS B	1	1	2	2

Вариабельные элементы 5'-НТО ВКЭ				
B2	4	4	3	3
C1	5	5	11	11
C2	8	10	10	12
Замены вне основных элементов	8	8	19	19

**Примечание.** В таблице 3.1 указано общее количество нуклеотидных замен в изолятах и лабораторных штаммах по отношению к прототипным ВКЭ (штаммы 205 и Заусаев).

\* – Для анализа были использованы следующие природные изоляты: Республика Молдова – 9 изолятов ВКЭ (КТ205274 – КТ205282), Уральский регион – 13 (МТ002377 – МТ002389), Республика Коми – 4 (МТ002390, МТ002802 – МТ002804), Томск – 2 (МТ002805, МТ002806), Новосибирск – 12 (МТ002807 – МТ002815, МТ015646 – МТ015648), Алтай – 3 (МТ002370 – МТ002372), Владивосток – 5 (МТ002369, МТ002373 – МТ002376).

\*\* – Для анализа были использованы следующие лабораторные штаммы ВКЭ: Заусаев, Васильченко, С11-13, Коларово, Латвия-1-96, ЕК-328 (все сибирского генотипа); 205, Глубинное-2004, Софьин, Томск-РТ12, Томск К6, Oshima 5-10 (дальневосточного генотипа); Neudoerf (европейского генотипа).

В то же время, элементы A2, CS A, CS B и район стартового кодона не содержали или содержали единичные нуклеотидные замены. Элементы CS A и старт кодон ATG были наиболее консервативны и, нам не удалось выявить в их структуре нуклеотидных замен во всех секвенированных вариантах. Консерватизм элемента CS A, по всей вероятности, связан с его ролью в эффективной инициации РНК-полимеразы и синтезом вирусной РНК у различных флавивирусов (Liu et al., 2016). Конформация этого района определяет как циклизацию генома, так и репликацию вирусной РНК, что предопределяет

консерватизм нуклеотидной последовательности данных элементов 5'-НТО генома ВКЭ.

Обращает внимание, что вариабельный элемент С1 несет пять строго консервативных замен для всех 39 изолятов ВКЭ, выделенных из клещей. Один паттерн был абсолютно идентичен для всех сибирских вариантов, а другой его вариант характерен для всех дальневосточных вариантов ВКЭ из клещей, собранных в различных географических районах. Можно предположить, что данные замены обусловлены необходимостью репликации вируса в клетках таежного клеща.

Следует отметить, что у культивируемых в лабораторных условиях штаммов ВКЭ замен в элементе С1 и вне основных доменов было выявлено в два раза больше, чем в исследованных природных изолятах. В условиях лаборатории, при культивировании штаммов ВКЭ, накапливаются адаптивные нуклеотидные замены. Это позволяет высказать предположение, что данные районы могут быть вовлечены в адаптацию ВКЭ при культивировании в лабораторных условиях на клетках млекопитающих.

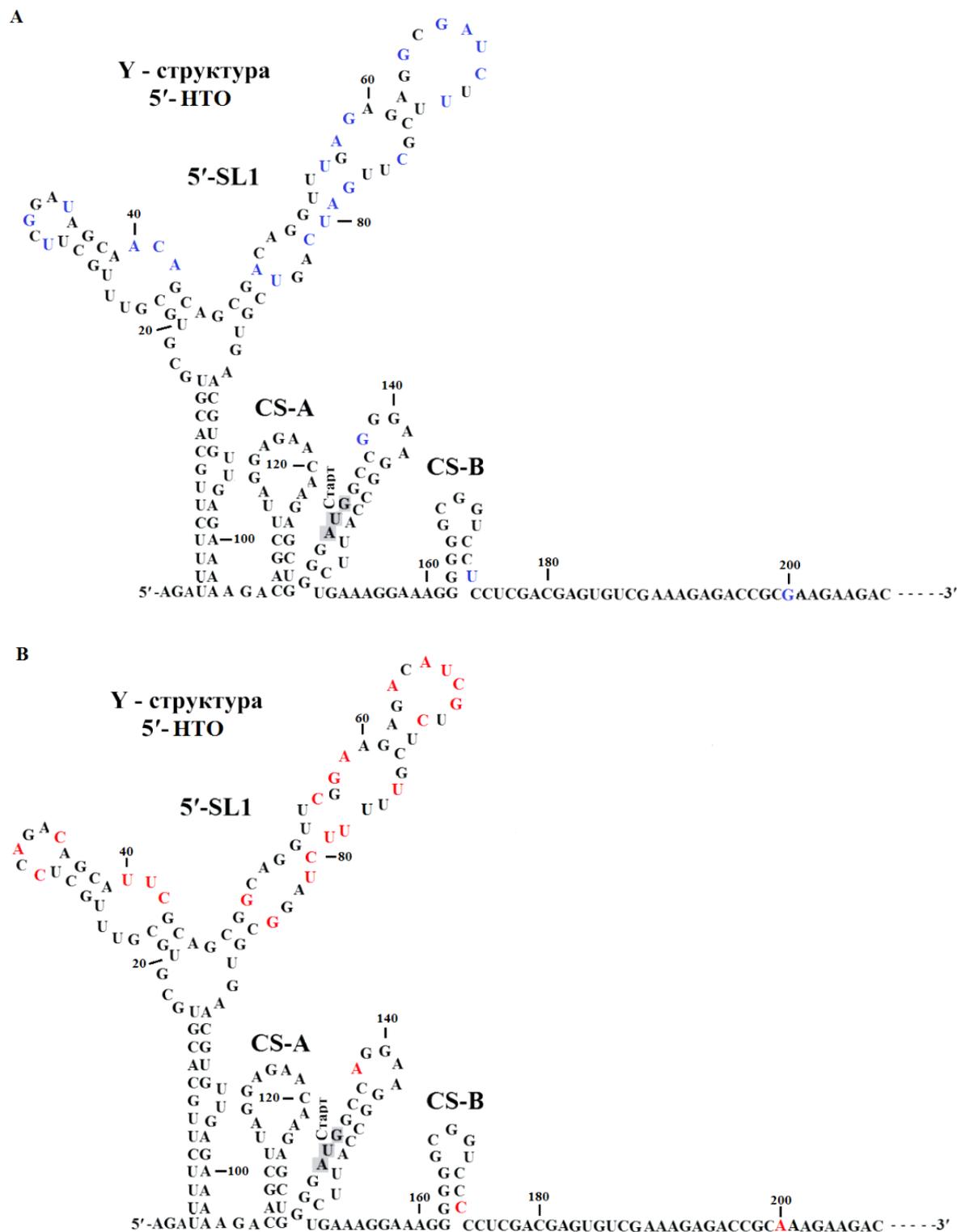
Практически у всех изолятов из Республики Молдова была также обнаружена сдвоенная замена в позициях Т(30) и Т(35) на С между элементами В1 и В2 (рисунок 3.2). Эта сдвоенная замена ассоциируется с районом связывания вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы и может быть обусловлена необходимостью оптимизации репликации вируса в клетках хозяина под воздействием необычных природных условий и/или необходимостью адаптации к новым типам хозяев. Ранее, эта сдвоенная замена была выявлена у высокопатогенного для человека ВКЭ, дальневосточного штамма Глубинное (Ternovoi et al., 2007). Данный штамм отличается высокой эффективностью синтеза вирусных белков и высокая скорость формирования инфекционных вирусных частиц. По этим показателям, он в 5 – 10 раз превышает прототипный штамм 205 дальневосточного генотипа ВКЭ.



Novosibirsk 1-14(MT002807)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	17
Novosibirsk 2-14(MT002808)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	17
Novosibirsk 3-14(MT002809)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - - G T C . . . . .	17
Novosibirsk 5-14(MT002810)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	- -	- -	17
Novosibirsk 7-14(MT002811)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	17
Novosibirsk 11-14(MT002812)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	17
Novosibirsk 12-14(MT002813)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	14
Novosibirsk 13-14(MT002814)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	14
Novosibirsk 14-14(MT002815)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	14
Novosibirsk 19-14(MT015648)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	14
Novosibirsk 201-14(MT015647)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	14
Novosibirsk 202-14(MT015646)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	17
Altay 9-14(MT002370)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	16
Altay 81-14(MT002371)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	17
Altay 82-14(MT002372)	. . . . .	. . . . . A C G . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	17
VI-17-376-13(MT002373)	. . . . .	. . . . . A C - . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	T A T	C . T . . . . C . . . - G T T C . . . . .	17
VI-28-293-13(MT002374)	. . . . .	. . . . . A C - . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	16
VI-30-290-13(MT002375)	. . . . .	. . . . . A C - . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	T A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	16
VI-35-316-13(MT002376)	. . . . .	. . . . . A C - . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	16
VI-41-286-13(MT002369)	. . . . .	. . . . . A C - . . . .	. . . . . A . . . . . T A G . . . . . G .	G A T	C . T . . . . C . . . - G . T C . . . . .	16
<b>Выделенные изоляты (Сибирский генотип)</b>						
Komi 1-k26-14(MT002390)	. . . . .	. . . . . - . . . . .	. . . . . - . . . . .	. . . T	. . . . .	1
Komi 1-k76-14(MT002802)	. . . . .	. . . . . - . . . . .	. . . . . - . . . . .	. . . T	. . . . .	1
Komi 2-154-14(MT002803)	. . . . .	. . . . . - . . . . .	. . . . . - . . . . .	. . .	. . . . .	0
Komi 28-n121-14(MT002804)	. . . . .	. . . . . - . . . . .	. . . . . - . . . . .	. . . T	. . . . . T . . . . .	2
Tomsk 17-f73-25-14(MT002805)	. . . . .	. . . . . - . . . . .	. . . . . - . . . . .	. A T	C . . . . .	3
Tomsk 18-f3-2-13(MT002806)	. . . A . . . . .	. . . . . - . . . . .	. . . . . - . . . . .	G . T	. . . . .	3

**Рисунок 3.2** Фрагмент (30 – 89 п. о.) выровненных нуклеотидных последовательностей 5'-НТО изолятов ВКЭ, в сравнении с прототипной последовательностью штамма Zausaev сибирского генотипа. Рамками выделены основные структурные элементы 5'-НТО ВКЭ. \* – общее количество замен в нуклеотидных последовательностях. Полные данные по выравниванию нуклеотидных последовательностей 5'-НТО представлены в Приложении 1.

На рисунке 3.3 представлена предполагаемая модель циклизации 5'-НТО у ВКЭ.



**Рисунок 3.3** Структура РНК (А), построенная на основе прототипной последовательности генома штамма 205 (JX498939). Локализация нуклеотидных замен в 5'-НТО ВКЭ у изолятов ВКЭ, выделенных из таежных клещей, и их позиции по отношению к прототипной последовательности (В). Вторичная

структура 5'-НТО геномной РНК ВКЭ была предсказана с помощью сервера MFOLD 3.4 (Markham, Zuker, 2008).

Совершенно очевидно, что в Y-структуре 5'-НТО нуклеотидные замены у различных штаммов происходят только в петлевых структурах, не затрагивая шпильчатые. Это подтверждает предположение, что обнаруженные нуклеотидные замены в петлевых районах Y-структуры могут быть вовлечены в обеспечение эффективной репликации ВКЭ в клетках таежного клеща. Нуклеотидные замены в петлевых структурах Y-структуры являются компенсационными и не влияют критически на компетенцию репликации вируса.

Полученные нами данные подтверждают наличие консервативных и переменных районов 5'-НТО РНК ВКЭ. Биологический смысл данной генетической изменчивости может быть связан с необходимостью обеспечения репликации вируса в различных типах клеток и различных хозяевах. Клетки клещей очень существенно отличаются от клеток птиц и млекопитающих. Температура клеща фактически не отличается от температуры окружающей среды, что требует возможности обеспечения работы ферментных систем для синтеза вирусной РНК и вирусных белков при пониженных температурах.

Некоторыми авторами также высказано предположение о том, что изменчивость 5'-НТО обеспечивает микроэволюцию ВКЭ в иксодовых клещах и в клетках различных видов резервуарных хозяев в природных очагах (Casati, 2006).

Таким образом, анализ 5'-НТО геномной РНК ВКЭ из клещей, собранных в различных природных очагах показал, что идентичность последовательностей сибирского и дальневосточного генотипов ВКЭ составила в среднем 89 и 95 соответственно, в сравнении с прототипными штаммами (Заусаев и 205).

В 5'-НТО РНК были выявлены переменные и консервативные мотивы. Наибольшей изменчивостью отличались элементы В2, С1 и С2 Y-образной структуры 5'-НТО и предполагаемый сайт связывания вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. Элементы А2, CS\_A, CS\_B и стартовый кодон были

консервативными. При этом, у природных вариантов ВКЭ, в переменном элементе С1 пять замен были строго консервативными, тогда как у лабораторных вариантов ВКЭ, в этом же элементе, выявлено 12 различных замен. Чуть менее трети нуклеотидных замен картированы вне основных элементов Y-образной структуры и, как правило, локализовались в петлевых структурах, не затрагивая шпильчатые области 5'-НТО ВКЭ. Полученные результаты показывают существенную переменность 5'-НТО геномной РНК лабораторных штаммов и полевых изолятов ВКЭ. Возможно, генетическая переменность 5'-НТО ВКЭ может быть структурной основой эффективной репликации ВКЭ в различных клетках птиц, млекопитающих и иксодовых клещей.

Обнаруженные нуклеотидные замены, по всей вероятности, могут приводить к изменению вторичной структуры РНК 5'-НТО генома ВКЭ и имеют принципиальное значение для адаптации вируса в природных очагах к новым видам переносчиков и хозяев. Успешность адаптации ВКЭ к изменяющимся условиям может быть обеспечена определенными генетическими механизмами. Предполагается, что переменность нуклеотидной последовательности 5'-НТО может предопределять эффективность репликации ВКЭ в иксодовых клещах и в клетках других резервуарных хозяев в природных очагах (Casati et al., 2006). Это предположение основано на данных о локализации в 5'-НТО геномной РНК флавивирусов сайтов связывания вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы и взаимодействии с рибосомами клетки хозяина для обеспечения синтеза вирусного полипротеина. Знание и понимание пределов переменности вирусного генома принципиально важно как для лучшей диагностики флавивирусных инфекций, так и для совершенствования профилактики и лечения КЭ.

Стоит также отметить, что в регионе Юго-Восточной Европы, на территории Республики Молдова, РНК ВКЭ дальневосточного генотипа была выявлена впервые. РНК ВКЭ дальневосточного генотипа была обнаружена у клещей трех разных видов – *I. ricinus*, *Dermacentor spp.* и *Haemaphysalis spp.* Ранее, ВКЭ дальневосточного генотипа был выявлен только в иксодовых клещах, собранных в Республике Крым, а также в некоторых европейских странах (Chausov et al.,

2009; Субботина, Локтев, 2012). В то же время, клещи *I. ricinus* – основной переносчик ВКЭ европейского генотипа – являются преобладающим видом клещей в Республике Молдова (Chausov et al., 2010; Chicu et al., 2013). Эти данные подтверждают, что распространение ВКЭ дальневосточного генотипа в Европе шире, чем предполагалось ранее (Gritsun et al., 2003a ; Iurchenko et al., 2012; Kovalev et al., 2010; Субботина, Локтев, 2012).

Напротив, у клещей *I. persulcatus*, собранных в природных биотопах Республики Коми, был подтвержден ВКЭ сибирского генотипа. Высказано предположение, что ВКЭ сибирского генотипа был относительно недавно интродуцирован в природные очаги Республики Коми из Уральского и Сибирского регионов.

### **3.2 Выделение и характеристика высокопатогенного штамма С11-13 вируса клещевого энцефалита**

В 2013 году в Мошковском районе Новосибирской области был зарегистрирован случай заболевания человека клещевым энцефалитом со смертельным исходом. Протекание заболевания было стремительным. На 12 день после укуса клеща пациентка поступила в тяжелом состоянии в реанимационное отделение районной больницы. Через неделю она была переведена на искусственную вентиляцию легких, через сутки скончалась в Городской инфекционной больнице № 1.

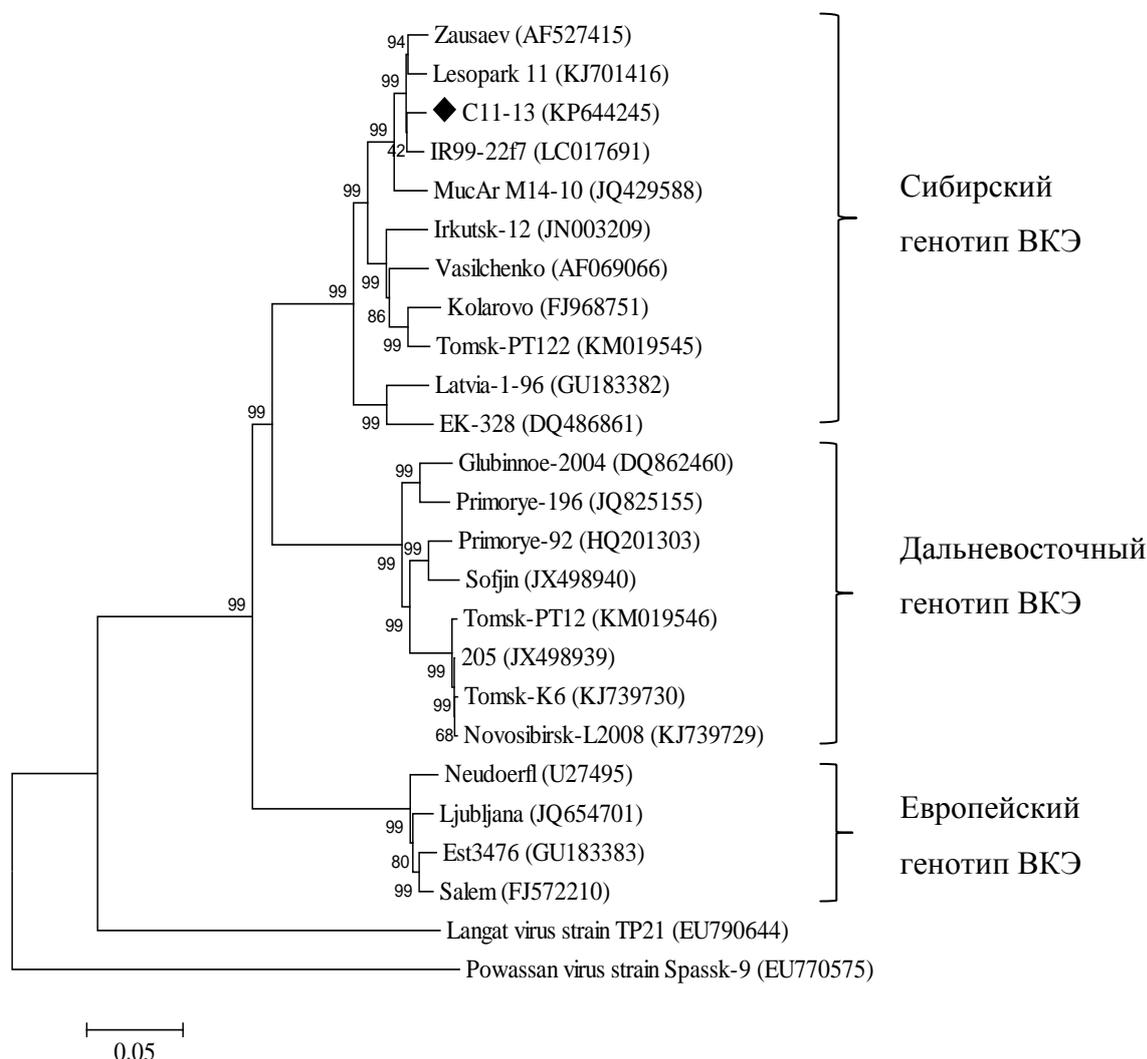
Из мозговой суспензии, погибшей от клещевой инфекции, нами был выделен изолят С11-13 ВКЭ. Путем последовательных пассажей на культурах клеток почки эмбриона свиньи (SPEV), нормальных клетках эмбриональных почек человека (НЕК 293) и нейронов мыши (Neuro-2a), был получен набор вариантов ВКЭ (GenBank С11-13 РЕК MF043953, С11-13-293 MF043954, С11-13-NEU MF043955).

Секвенирование вирусных геномов штамма С11-13 после 1, 3, 5, 6 и 8 пассажей, позволило выявить различные аминокислотные и нуклеотидные замены в лабораторно адаптированных вариантах ВКЭ.

Филогенетический анализ показал, что штамм С11-13 относится к западносибирскому субтипу ВКЭ (рисунок 3.4). При этом он образовал общую ветвь со штаммами, выделенными ранее в Дальневосточном регионе России и в Монголии: Lesopark-11(KJ701416), Zausaev(AF527415), IR99-22f7(LC017691) и MucAr M14/10(JQ429588).

Длина геномной РНК изолята С11-13 ВКЭ составила 10 801 (после адаптации 10 838) н. Уровень гомологии по нуклеотидной последовательности внутри сибирского генотипа составил от 94 до 98%, а для аминокислотной последовательности от 96 до 99% (таблица 3.2). Для дальневосточных ВКЭ уровень гомологии нуклеотидной последовательности составил 94 – 95% и для европейских штаммов 85 – 93%. При этом уровень гомологии по аминокислотной

последовательности дальневосточных и европейских генотипов ВКЭ был от 94 до 98%.



**Рисунок 3.4** Филодендрограмма, отображающая генетическую близость исследуемого штамма С11-13 ВКЭ и известных полноразмерных нуклеотидных последовательностей ВКЭ, взятых из базы данных GenBank. Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-х параметрической модели Кимуры.

Количество аминокислотных замен у штамма С11-13 ВКЭ было наибольшим в сравнении с дальневосточными штаммами – более 160 замен на геном (таблица 3.3). При этом количество синонимичных аминокислотных замен было больше 70 на геном, а несинонимичных – более 90 замен на геном.

**Таблица 3.2 Уровень гомологии нуклеотидной/выведенной аминокислотной последовательности штамма С11-13, в сравнении с прототипными штаммами ВКЭ (%).**

Штамм	Участки генома													
	5'- НТО	С- СТНД	preM	Е	NS1	NS2a	NS2b	NS3	NS4a	2К	NS4b	NS5	3'- НТО	всего
<b>Сибирский генотип</b>														
Lesopark 11 (KJ701416)	99	99/98	99/99	98/99	98/100	98/100	97/98	99/99	98/99	99/100	99/99	98/98	91	98/99
Vasilchenko (AF069066)	96	97/96- 95	96/98	94/98	95/99	94/98	94/97	95/99	95/99	96/100	94/99	94/98	97	94/98
Kolarovo-2008 (FJ968751)	97	95/91	96/98	94/97	94/99	93/97	93/97	94/96	94/98	94/100	94/97	93/94	97	94/96
IR99-22f7 (LC017691)	98	99/98	99/100	98/99	98/99	98/99	96/98	98/99	98/100	99/100	99/99	98/99	99	98
MucAr M14/10 (JQ429588)	-	98/97	98/100	96/99	97/99	97/99	96/97	97/99	98/100	99/100	97/99	96/99	-	97
Zausaev (AF527415)	98	98/96	99/99	98/99	98/99	99/100	97/98	98/99	98/100	99/100	98/99	98/99	98	98/99
<b>Дальневосточный генотип</b>														
205(JX498939)	89	89/88	85/95	85/97	85/96	81/87	86/94	87/97	85/94	90/100	83/94	86/95	-	86/95
Tomsk-K6 (KJ739730)	88	89/88	85/94	85/96	85/96	81/87	85/93	87/96	85/94	90/100	82/93	86/94	91	85/94
Tomsk-PT12 (KM019546)	89	89/88	85/95	85/96	85/96	82/87	85/94	87/97	85/95	90/100	83/94	86/94	93	85/95
Novosibirsk-L2008 (KJ739729)	88	89/88	85/94	85/97	85/96	81/87	85/93	86/96	84/94	90/100	82/95	86/95	93	85/95

**Продолжение таблицы 3.2**

Glubinnoe-2004 (DQ862460)	87	88/88	86/94	86/97	85/96	83/88	87/95	87/97	86/94	90/100	83/95	86/94	91	86/95
Primorye-92 (HQ201303)	-	87/90	85/95	85/97	86/96	81/88	85/94	86/97	85/95	91/100	83/95	87/95	94	86/95
Primorye-196 (JQ825155)	87	88/89	86/95	85/97	86/96	82/88	85/94	87/97	87/95	91/100	83/94	86/95	93	86/95
Sofjin (JX498940)	89	87/89	86/95	85/97	86/96	81/88	85/93	86/97	84/95	90/100	83/94	86/94	91	85/95
<b>Европейский генотип</b>														
Latvia-1-96 (GU183382)	95	95/94	92/97	93/98	92/99	93/98	91/97	94/99	92/99	94/96	93/98	93/97	84	93/98
EK-328 (DQ486861)	94	95/94	93/96	93/98	93/99	93/99	90/95	94/99	92/100	94/96	93/98	92/97	84	93/98
Neudoerfl (U27495)	92	86/83	86/95	85/96	85/94	82/89	83/91	85/95	88/98	84/100	83/93	86/95	93	85
Est3476 (GU183383)	-	87/83	86/94	85/96	85/94	83/88	83/92	85/95	87/98	84/100	83/94	87/95	-	85/94

**Таблица 3.3 Количество нуклеотидных и аминокислотных замен ВКЭ штамма С11-13, в сравнении с прототипными штаммами.**

Штамм	Количество нуклеотидных замен	% гомологии по а.п.	Аминокислотные замены		
			всего	синонимичные	несинонимичные
Западносибирские генотипы ВКЭ					
Lesopark 11(KJ701416)	199	99%	25	11	14
Vasilchenko (AF069066)	600	98%	56	24	32
Kolarovo-2008 (FJ968751)	626	96%	126	67	59
Zausaev (AF527415)	227	99%	26	13	13
Дальневосточные генотипы ВКЭ					
205( JX498939)	1506	95%	172	74	98
Tomsk-K6( KJ739730)	1549	94%	188	86	102
Tomsk-PT12 (KM019546)	1538	95%	181	84	97
Novosibirsk-L2008 (KJ739729)	1546	95%	183	84	99
Glubinnoe-2004 (DQ862460)	1487	95%	175	77	98
Primorye-92 (HQ201303)	1488	95%	161	71	90
Primorye-196 (JQ825155)	1505	95%	165	71	94
Sofjin (JX498940)	1518	95%	173	83	90
Европейские генотипы ВКЭ					
Latvia-1-96 (GU183382)	731	98%	70	31	39
EK-328 (DQ486861)	762	98%	61	30	31
Est-3476 (GU183383)	1540	94%	196	76	120

После третьего пассажа на клетках SPEV были выявлены первые изменения в вирусных белках штамма С11-13. Замены произошли в NS3 (H1745Q) и NS5 (S2925F), а к восьмому пассажиру обнаружено уже 25 нуклеотидных замен в геноме, которые привели к 8 аминокислотным заменам в белках: E (Q367R), NS1

(N1067D), NS2a (L1168V), NS3 (R1488Q, D1511N и H1745Q) и NS5 (M2562K и S2925F) (Таблица 3.4).

**Таблица 3.4** Аминокислотные замены в белках ВКЭ штамма С11-13 при пассировании на культурах клеток SPEV, НЕК 293 и Neuro-2a.

№	Аминокислота	Ген	Пассажи на SPEV					Пассажи на 293				Пассажи на Neuro-2a					
			1	3	5	6	8	1	3	6	8	1	3	5	6	8	
1	367	E	Q	Q	Q	R	R	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
2	429	E	D	D	D	D	D	D	D	E	E	D	D	D	D	D	D
3	863	NS1	T	T	T	T	T	T	T	P	P	T	T	T	T	T	T
4	1067	NS1	N	N	D	D	D	N	N	D	D	N	N	D	D	D	D
5	1168	NS2a	L	L	V	V	V	L	V	V	V	L	V	V	V	V	V
6	1488	NS3	R	R	Q	Q	Q	R	R	Q	Q	R	R	R	R	R	R
7	1511	NS3	D	D	N	N	N	D	D	N	N	D	D	D	D	D	D
8	1678	NS3	T	T	T	T	T	T	T	A	A	T	T	T	T	T	T
9	1745	NS3	H	Q	Q	Q	Q	H	Q	Q	Q	H	Q	Q	Q	Q	Q
10	1801	NS3	E	E	E	E	E	E	E	K	K	E	E	E	E	E	E
11	1802	NS3	N	N	N	N	N	N	N	K	K	N	N	N	N	N	N
12	1906	NS4a	F	F	F	F	F	F	S	S	S	F	F	F	S	S	S
13	2237	NS4b	S	S	S	S	S	S	S	N	N	S	S	S	S	S	S
14	2562	NS5	M	M	K	K	K	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
15	2925	NS5	S	F	F	F	F	S	S	F	Q	S	S	S	S	S	S
16	3213	NS5	S	S	S	S	S	S	S	P	P	S	S	S	S	S	S

**Примечание:** однобуквенный код – Q (глутамин), R (аргинин), D (аспарагиновая кислота), E (глутаминовая кислота), T (Треонин), P (пролин), N (аспарагин), L (лейцин), V (валин), A (аланин), H (гистидин), K (лизин), F (фенилаланин), S (серин), M (метионин).

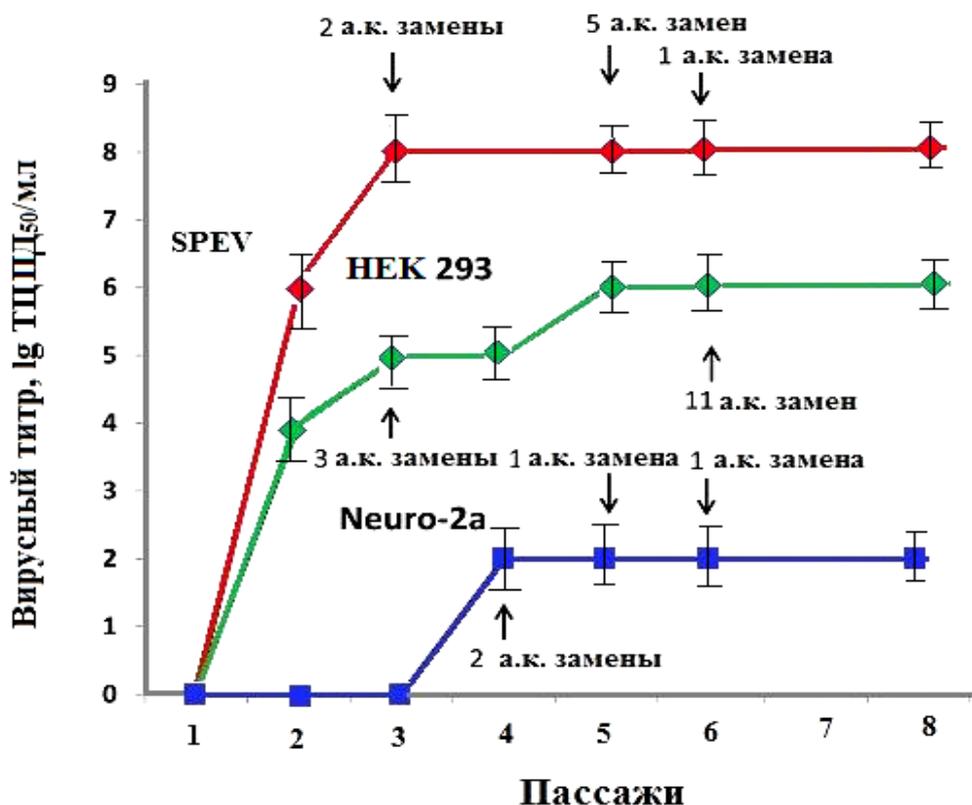
Замены в NS1 (N1067D), NS2a (L1168V) и NS3 (H1745Q) были характерны для всех использованных в эксперименте культур клеток – SPEV, НЕК 293 и Neuro-

2а. Это свидетельствует о том, что данные замены имеют наибольшее значение при адаптации ВКЭ и не зависят от вида клеток.

В тоже время, некоторые замены в вирусных белках штамма С11-13 были характерны только при пассировании на определенной культуре клеток (SPEV и НЕК 293). Эти замены выявлены как в структурных, так и в неструктурных белках. Так, у вариантов ВКЭ С11-13, адаптированных на клетках НЕК 293, обнаруженные замены локализовались в белках: Е (D429E), NS1 (T863P), NS3 (T1678A, E1801K, N1802K), NS4b (S2237N), NS5 (S3213P). А у варианта ВКЭ С11-13, пассированном на клетках SPEV, специфичные аминокислотные замены обнаружены в белках Е (Q367R) и NS5(M2562K). У варианта ВКЭ С11-13, адаптированного к клеткам Neuro-2а обнаружена 1 общая замена со штаммом, адаптированным к клеткам НЕК 293, которая находилась в неструктурном белке NS4а (F1906S), остальные были общими для всех трех культур клеток. Данные представлены в таблице 3.4.

Исследование динамики накопления вируса в клетках показало, что к пятому пассажу на всех культурах клеток (SPEV, НЕК 293, Neuro-2а ) штамм С11-13 приобрел более высокий вирусный титр. На рисунке 3.5 представлен график изменения вирусного титра штамма С11-13 на культурах клеток SPEV, НЕК 293, Neuro-2а на 7-й день после заражения клеток. Так, после третьего пассажа штамма С11-13 на клетках SPEV, с появлением первых аминокислотных замен в NS3 (H1745Q) и NS5 (S2925F) титр вируса увеличился с  $10^6$  до  $10^8$  ТЦПД<sub>50</sub>/мл (рисунок 3.5), а на клетках НЕК 293 – титр увеличился с  $10^3$  до  $10^6$  ТЦПД<sub>50</sub>/мл к пятому пассажу с появлением 11 замен в белках: Е (1 замена), NS1 (2), NS3 (5), NS4b (1), NS5 (2). В тоже время, вариант штамма С11-13 на Neuro-2а с меньшим количеством замен, стал реплицироваться к четвертому пассажу с появлением аминокислотных замен в NS2а (L1168V) и NS3 (H1745Q) и обладал наименьшим значением вирусного титра –  $10^2$  ТЦПД<sub>50</sub>/мл (рисунок 3.5). Наибольшее накопление антигена наблюдали после третьего пассажа на клетках, как раз тогда,

когда произошли первые аминокислотные замены в NS1 (N1067D), NS2a (L1168V), NS3 (H1745Q) и NS5 (S2925F).



**Рисунок 3.5** Динамика накопления титра ВКЭ штамма C11-13 на культурах клеток SPEV, HEK 293, Neuro-2a. Вирусный титр определяли по ТЦПД<sub>50</sub>/мл в 96-луночных планшетах на 7-й день после заражения. Стандартное отклонение – 0,3-0,5 lgТЦПД<sub>50</sub>/мл.

Анализ пространственных моделей (Popomareva et al., 2017) локализовал аминокислотные замены для NS3 в активных центрах сериновой протеазы (2 замены → H1488Q и D1511N) и геликазы (1 замена → H1745Q). Также была обнаружена одна аминокислотная замена в активном центре вирусной РНК полимеразы (NS5→S2925F).

После шестого пассажа C11-13 на клетках SPEV в белке E была выявлена аминокислотная замена Q367R. Аналогичная мутация описывалась ранее для ВКЭ европейского субтипа (Mandl et al., 2001). Эта замена приводит к увеличению

положительного заряда в домене II белка E и может влиять на взаимодействие с гликозаминогликанами, которые являются вирусными рецепторами на поверхности клетки-хозяина.

Интересно, что после 3-8 пассажей на всех клеточных линиях у вируса обнаружены замены в белке NS1 (Asn1067Asp) и NS2a (Leu1168Val). Замена в NS1 N1067D (Asn → Asp) не влияет на домен I (778-935 а.о.) и домен II (936-1013 а.о.), которые играют существенную роль в репликации вируса (Muller, Young, 2013). Выдвинута гипотеза, что из-за появления отрицательно заряженной карбоксильной группы аминокислотное замещение N1067D может повлиять на вторичную структуру и растворимость белка.

Известно, что N-конец белка NS2a вирусов японского энцефалита и желтой лихорадки участвуют в сборке вирусных инфекционных частиц и распространении вируса *in vitro* (Haruarachchi et al., 2015). А замена 1168 (Leu → Val) была обнаружена на N-конце белка NS2a и оказалась идентична для всех трех типов клеток, которая может работать как усилитель репликации.

Таким образом, в процессе пассирования на клетках млекопитающих были получены быстрорастущие варианты штамма С11-13 ВКЭ, при этом штамм приобрел ряд нуклеотидных и аминокислотных замен, которые произошли как в неструктурных, так и в структурных белках ВКЭ штамма С11-13.

Обнаруженные нуклеотидные и аминокислотные замены, как мы предполагаем, связаны с адаптацией природного изолята ВКЭ к новому хозяину, в данном случае к культуре клеток.

Поскольку все лабораторные штаммы С11-13 вируса клещевого энцефалита были получены нами в лабораторных условиях с помощью многократных серийных пассажей на клеточных культурах, вопрос генетической тождественности адаптированных лабораторных штаммов ВКЭ с природными вариантами ВКЭ, циркулирующими в очагах этой инфекции, остается актуальным.

### 3.3 Генетическая изменчивость ВКЭ при адаптации вируса от культур клеток к мелким млекопитающим

Штамм С11-13, предварительно пассированный на клетках SPEV, после 3 и 8 пассажей был использован для интрацеребрального заражения культуральной вирусосодержащей жидкостью беспородных мышей-сосунков. Инкубационный период до начала заболевания составил в среднем около 4 – 5 суток. Проявление инфекции выразилось в виде парезов и параличей. Титр вируса в 10% гомогенате мозга на 3 пассаже составил  $10^8 - 10^9$  ТЦПД<sub>50</sub>/мл.

После третьего пассажа на животных, из мозговой суспензии мышей были выделены два изолята ВКЭ С11-13\_ 3-3 и С11-13\_ 8-3. Установлено, что эти изоляты, в отличие от вариантов, адаптированных к культуре клеток, приобрели ряд нуклеотидных и аминокислотных замен.

Нуклеотидные замены в геномной РНК штамма С11-13 ВКЭ при пассажах на клетках SPEV и на животных представлены в таблице 3.5, а аминокислотные в таблице 3.6. Все замены локализовались в кодирующей части генома вируса. Всего было выявлено 44 нуклеотидных замены, из которых 11 были несинонимичные и располагались в неструктурных белках, за исключением двух замен в белке Е. Также, в пяти позициях белка NS3 был выявлен синонимичный однонуклеотидный полиморфизм.

Из 11 нуклеотидных замен (таблица 3.5), которые привели к замещению аминокислоты – три произошли при адаптации к новому хозяину – мышам. Одна в белке Е (G1039A) D → N и в две в белке NS3 (A5668T и T5717C) T → S и F → S, соответственно. Интересно то, что при пассажах на мышях (три пассажа) у вируса появились 6 аминокислотных замен, характерных для изолята вируса С11-13, выделенного от человека, но замещенных при последующих пассажах (8 пассажей) на линии клеток SPEV. Замены произошли в белке Е (Q367R), в NS1 (N1067D), в NS3 (R1488Q и D1511N) и в NS5 (M2561K и S2925F). Эти замены, возникли при адаптации вируса к другому хозяину – клеткам SPEV, и при адаптации ВКЭ к мышам становятся реверсными. Реверсные аминокислотные

замены в белках ВКЭ при смене хозяина – это ответ вирусной микропопуляции на смену одних клеточных белков хозяина на другие.

**Таблица 3.5 Нуклеотидные замены у ВКЭ штамма С11-13 при пассажах на клетках SPEV и на животных.**

№	Нуклеотид	Ген	Пассажи на культуре клеток SPEV (количество пассажей)				Пассажи на животных	
			1	3*	5	8*	3-3*	8-3*
1	240	C	A	G	G	A	G	G
2	1039	E	G	G	G	G	G	A
3	1100	E	A	A	A	G	A	A
4	1476	E	C	G	G	C	C	C
5	1704	E	A	A	A	A	G	G
6	1740	E	A	G	G	G	A	A
7	1743	E	C	T	T	T	C	C
8	1932	E	T	T	T	T	C	T
9	2379	E	A	A	A	A	G	G
10	3199	NS1	A	A	G	G	A	A
11	3498	NS1	T	A	A	A	A	A
12	3502	NS1	C	C	G	G	G	G
13	3810	NS2a	C	T	T	T	T	T
14	4044	NS2a	C	T	T	T	C	C
15	4090	NS2b	C	T	T	T	T	T
16	4350	NS2b	G	G	G	G	G	A
17	4463	NS2b	G	G	A	A	G	G
18	4531	NS3	G	G	A	A	G	G
19	4629	NS3	T	T	T	T	C	T

20	4635	NS3	A	A	A	A	G	G
21	4936	NS3	C	C	C	C	T	C
22	4991	NS3	G	A/G	G	G	G	G
23	5004	NS3	A	A	T/A	A	A	A
24	5007	NS3	G	G	T/G	G	G	G
25	5070	NS3	A	A	C/A	A	A	A
26	5235	NS3	T	A	A	A	A	A
27	5401	NS3	G	G	A/G	G	G	G
28	5634	NS3	C	T	T	T	C	C
29	5658	NS3	G	G	G	G	G	A
30	5668	NS3	A	A	A	A	A	T
31	5697	NS3	C	C	T	T	C	C
32	5717	NS3	T	T	T	T	C	C
33	768	NS5	T	T	A	A	T	T
34	8562	NS5	C	T	T	T	C	C
35	8586	NS5	A	G	G	G	A	A
36	8628	NS5	G	G	G	A	G	G
37	8774	NS5	C	T	T	T	C	C
38	9003	NS5	T	C	C	C	T	T
39	9060	NS5	G	A	A	A	G	G
40	9114	NS5	A	G	G	G	A	A
41	9126	NS5	C	C	C	C	C	T
42	9744	NS5	G	A	A	A	G	G
43	9750	NS5	C	T	T	T	C	C
44	10170	NS5	A	G	G	G	A	A

**Примечание:** 3-3\* – 3\* пассаж штамма C11-13 на культуре клеток SPEV → 3 пассаж на животных; 8-3\* – 8\* пассаж на культуре клеток SPEV → 3 пассаж на животных; серым цветом выделены позиции полипротеина с нуклеотидными заменами, которые привели к замещению аминокислоты, из них три связаны с

адаптацией к новому хозяину – мышам; зеленым – позиции белка NS3, где был выявлен синонимичный однонуклеотидный полиморфизм.

**Таблица 3.6** Аминокислотные замены в белках ВКЭ штамма С11-13 при пассажах на клетках SPEV, Neuro-2a и на животных.

№	Амино-кислота	Ген	Пассажи на культуре клеток SPEV (количество пассажей)			Пассажи на культуре клеток Neuro-2a (количество пассажей)				Пассажи на животных	
			1	3	8	1	3	5	6	3-3	8-3
1	347	E	D	D	D	D	D	D	D	D	N
2	367	E	Q	Q	R	Q	Q	Q	Q	Q	Q
3	1067	NS1	N	N	D	N	N	D	D	N	N
4	1168	NS2a	L	L	V	L	V	V	V	V	V
5	1488	NS3	R	R	Q	R	R	R	R	R	R
6	1511	NS3	D	D	N	D	D	D	D	D	D
7	1745	NS3	H	Q	Q	H	Q	Q	Q	Q	Q
8	1890	NS3	T	T	T	T	T	T	T	T	S
9	1906	NS3	F	F	F	F	F	F	S	S	S
10	2562	NS5	M	M	K	M	M	M	M	M	M
11	2925	NS5	S	F	F	S	S	S	S	S	S

**Примечание:** D – Аспаргиновая кислота, Q – Глутамин, R – Аргинин, N – Аспарагин, L – Лейцин, V – Валин, T – Треонин, S – Серин, M – Метионин, H – Гистидин, F – Фенилаланин, K – лизин; серым цветом выделены – замены, связанные с адаптацией к новому хозяину (к.к. SPEV → мыши); зеленым – реверсные замещения а.к. от человека → SPEV, а затем → клеткам мыши. Позиции аминокислот указаны по полипротеину.

В результате проведенного анализа геномной РНК ВКЭ С11-13, выделенного из мозга мышей-сосунков, нами были картированы нуклеотидные и аминокислотные замены в структурных и неструктурных белках вируса, свидетельствующие о существовании достаточно быстрого и эффективного процесса геномной изменчивости вирусной микропопуляции, связанного как с адаптацией природного изолята ВКЭ к новому хозяину, так и со сменой одного хозяина на другого.

Таким образом, высоковирулентный вариант ВКЭ С11-13, который был изолирован от человека после смертельной инфекции и адаптированный к клеткам головного мозга человека, при смене хозяина приобрел характерные геномные замены. Мы предполагаем, что эти нуклеотидные и аминокислотные изменения связаны с адаптацией (молекулярным отбором) естественной популяции ВКЭ к новому хозяину (от клеток человеческого мозга к культуре клеток мыши), и что замены в белках NS1, NS2a, NS3 и NS5, в данном случае, играют ключевую роль в адаптации к новому хозяину.

### 3.4 Генетическая изменчивость 3'-НТО геномной РНК ВКЭ при адаптации к различным типам клеток

При пассировании природного изолята ВКЭ С11-13 на культурах клеток SPEV, НЕК 293, Neuro-2a и его последующей адаптации на мышах, нами было выявлено увеличение длины 3'-НТО геномной РНК ВКЭ.

Для проведения сравнительного исследования НТО геномной РНК ВКЭ лабораторных штаммов со штаммом С11-13, было проведено секвенирование 17 полноразмерных геномов лабораторных штаммов ВКЭ различных генотипов из музея ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», а также 6 вариантов штамма ВКЭ С11-13. Последовательность штамма Neudoerfl была взята из международной базы GenBank.

В таблице 3.7 представлены результаты сравнения длины полных геномов и 3'-НТО ВКЭ, а также варибельного и консервативного региона 3'-НТО.

**Таблица 3.7 Сравнение длины полного генома и 3'-НТО геномной РНК различных штаммов ВКЭ.**

Штамм, GenBank	Полный геном	Варибельный регион 3'-НТО	Консервативный регион 3'-НТО	Полная длина 3'-НТО
<b>Европейский генотип</b>				
<b>Absettarov, KJ000002</b>	11097	402	321	723
Neudoerfl, U27495	11141	446	321	767
<b>Длина (нуклеотиды)</b>	<b>11097 – 11141</b>	<b>402 – 446</b>	<b>312</b>	<b>723 – 767</b>
<b>Сибирский генотип</b>				
<b>Kolarovo-2008, FJ968751</b>	10928	232	321	553
<b>Zausaev, AF527415</b>	10832	138	320	458
<b>Vasilchenko,</b>	10927	233	320	553

<b>AF069066</b>				
<b>Lesopark 11, KJ701416</b>	10886	182	320	502
<b>Buzuuchuk, KJ626343</b>	10923	229	320	549
<b>C11-13_1 пассаж</b>	10801	107	320	427
<b>C11-13_SPEV, MF043953</b>	10838	144	320	464
<b>C11-13_293, MF043954</b>	10823	129	320	449
<b>C11-13_Neu, MF043955</b>	10838	144	320	464
<b>C11-13_3-3</b>	11107	413	320	733
<b>C11-13_8-3</b>	11107	413	320	733
<b>Tomsk-PT122, KM019545</b>	10933	413	146	559
<b>Длина (нуклеотиды)</b>	<b>10802 – 10933</b>	<b>107 – 413</b>	<b>146 – 321</b>	<b>428 – 576</b>
<b>Дальневосточный генотип</b>				
<b>Glubinnoe/200, DQ862460</b>	10886	201	12	513
<b>4072, KF951037</b>	10894	201	20	521
<b>205, JX498939</b>	10495	67	5*	122*
<b>Sofjin, JX498940</b>	10894	201	20	520
<b>Tomsk-PT12, KM019546</b>	10780	92	20	512
<b>Tomsk-PT14, KJ914682</b>	10780	87	20	508
<b>Tomsk-M202, KJ914683</b>	10780	92	20	512
<b>Tomsk-M83,</b>	10785	87	25	507

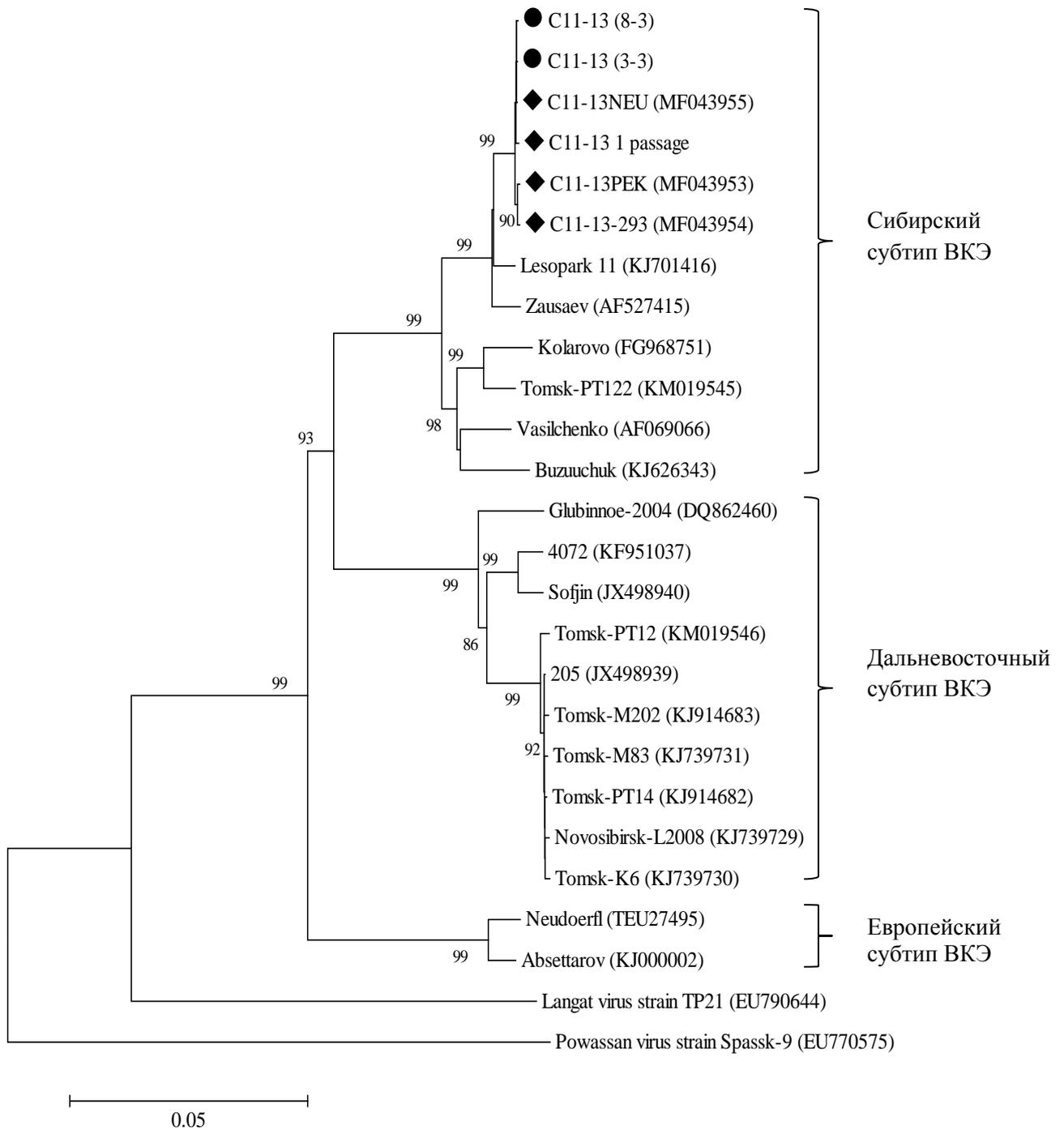
<b>KJ739731</b>				
<b>Tomsk-K6, KJ739730</b>	10776	87	16	503
<b>Novosibirsk- L2008, KJ739729</b>	10771	87	312	499
<b>Длина (нуклеотиды)</b>	<b>10495 – 10894</b>	<b>87 – 201</b>	<b>12 – 325</b>	<b>499 – 521</b>

**Примечание:** \* – недочитанная последовательность в консервативном регионе 3'-НТО; жирным шрифтом выделены штаммы, секвенированные в рамках данной работы.

Филогенетический анализ геномной РНК лабораторных штаммов и вариантов ВКЭ штамма С11-13 показал, что они относятся к трем основным генотипам ВКЭ (рисунок 3.6). К дальневосточному генотипу были отнесены 10 штаммов, из них – 205, 4072 и Софьин были выделены и описаны в период с 1937 по 1973 гг, а другие семь штаммов представлены более современными вариантами ВКЭ, которые выделены нами в период с 2004 – 2008 годов. Два штамма сибирского генотипа были представлены вариантами 1986 года (Средняя Азия и Новосибирская область) и 5 вариантов – 2008 – 2013 гг. (Томская и Новосибирская области). Штамм С11-13 группировался вместе с другими штаммами сибирского генотипа, выделенными ранее (рисунок 3.6). Европейский геновариант представлен штаммами – Absettarov 1951 г. (Карелия) и Neudoerfl 1996 г. (Austria).

Дополнительное сравнение известных полногеномных нуклеотидных последовательностей ВКЭ взятых из международной базы GenBank (18 штаммов европейского субтипа, 55 штаммов сибирского субтипа и 71 штамма дальневосточного субтипа), с нашими вариантами ВКЭ показало, что средний размер длины генома отличается, начиная от европейского, приблизительно на

100 нуклеотидов для каждого из генотипов в сторону уменьшения размера генома.



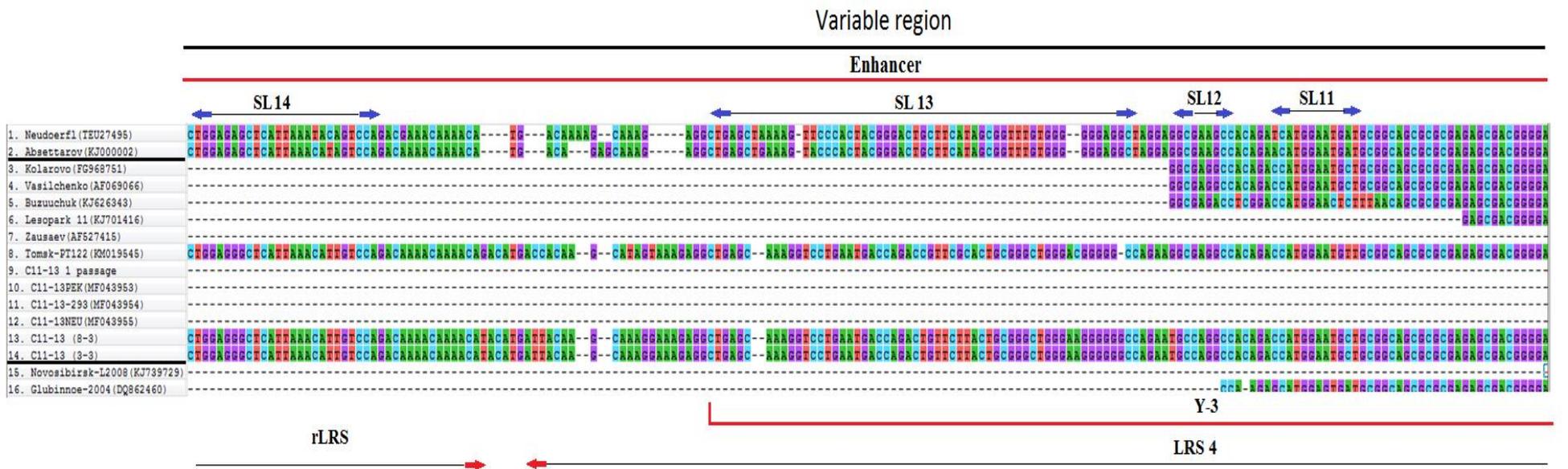
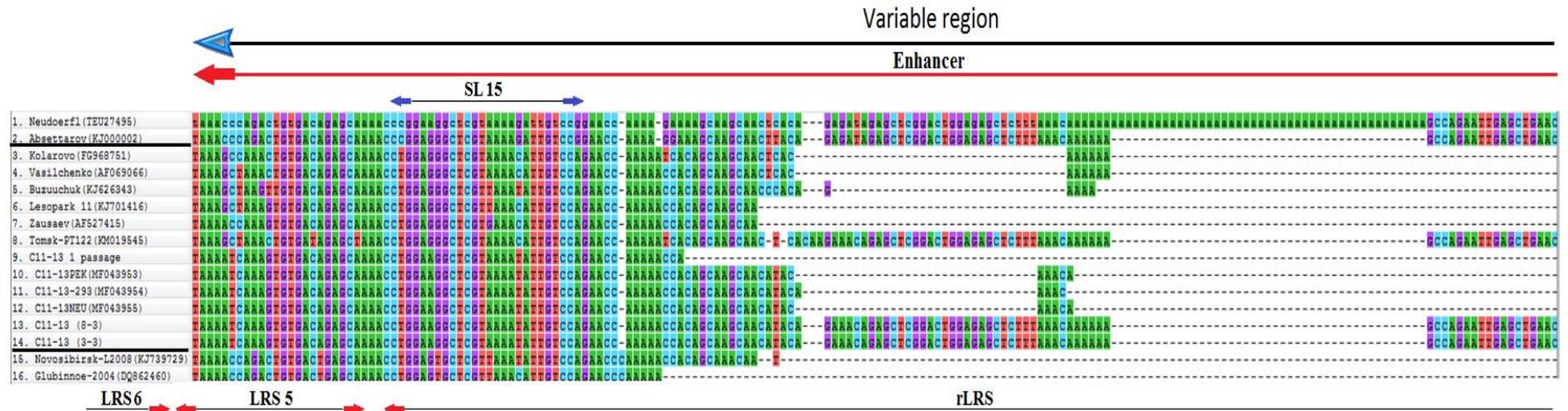
**Рисунок 3.6** Филогенетическое дерево, построенное для полноразмерных нуклеотидных последовательностей ВКЭ. Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-х параметрической модели Кимуры. Приведены оригинальные названия штаммов ВКЭ и номера

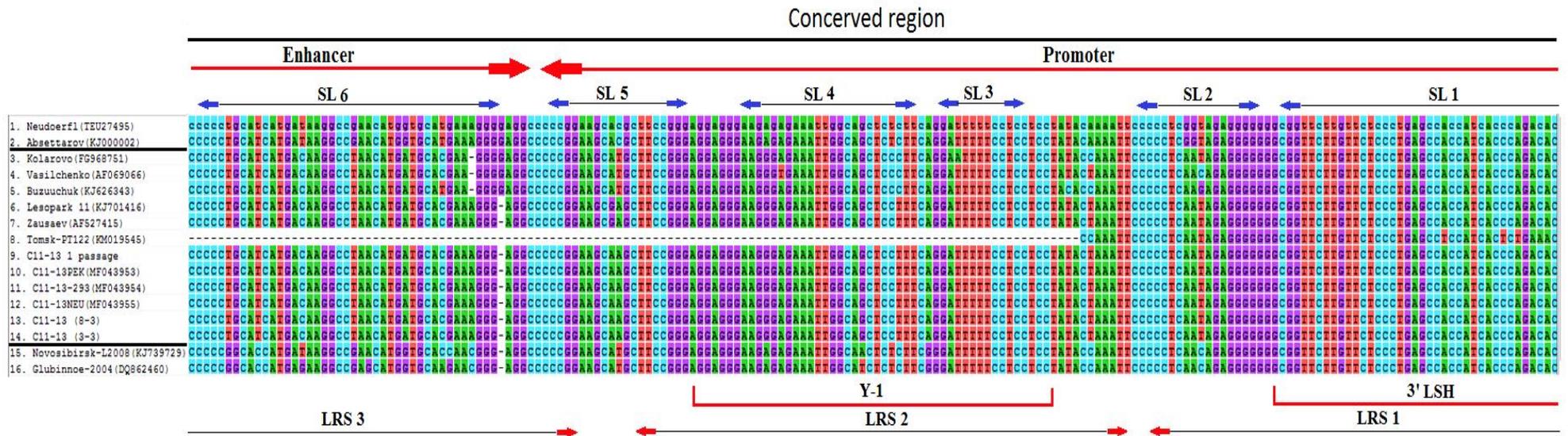
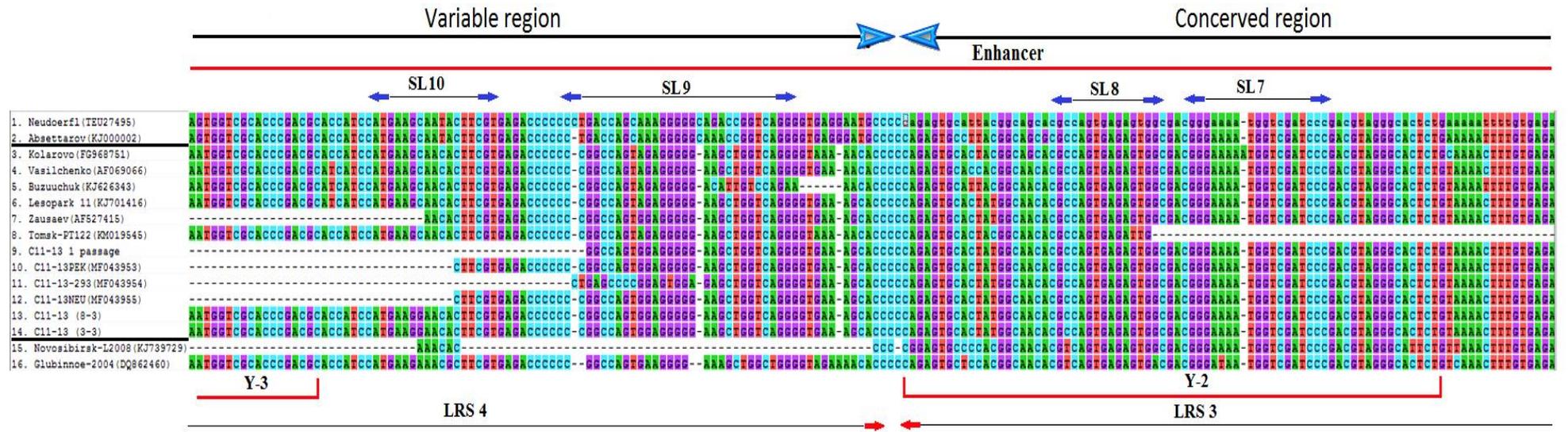
последовательностей, депонированных в GenBank. ● – варианты ВКЭ штамма С11-13 пассированные на мелких млекопитающих; ◆ – варианты ВКЭ штамма С11-13 пассированные на различных культурах клеток.

Как известно, 3'-НТО ВКЭ разделяется на консервативный и переменный регионы 3'-НТО, которые включают 6 длинных повторяющихся последовательностей (LRS – long repeat sequences) (Gritsun, Gould, 2007). Основную роль в изменениях размера вирусного генома играет гетерогенность переменного региона 3'-НТО. Если переменный регион 3'-НТО штаммов европейского генотипа колеблется от 402 до 446 нуклеотидов, то для штаммов дальневосточного и сибирского генотипов он составляет 87 – 201 и 107 – 413 нуклеотидов соответственно.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей показало, что наибольшую длину 3'-НТО имеют штаммы Absettarov и Neudoerfl, относящиеся к европейскому генотипу. У штамма Absettarov регион Poly(A) значительно сокращен, а у штаммов других генотипов он либо не определен, либо совсем отсутствует. Наименьший размер генома был характерен для всех штаммов дальневосточного генотипа. Консервативный регион 3'-НТО остается неизменным, а делеции происходят в переменной части 3'-НТО, а именно в районе от Poly(A) до Poly(C). Для данного района характерно образование Y-образной структуры. С пассажной историей длина этого района увеличивается и Y-структура приобретает дополнительные петли.

В качестве якорей для выравнивания 3'-НТО последовательностей были взяты консервативные последовательности прототипных ВКЭ (лабораторные варианты ВКЭ, прошедшие множественные пассажи на различных клетках) (рисунок 3.7).







При экспериментальной адаптации штамма С11-13 ВКЭ сибирского генотипа к клеткам SPEV, НЕК 293, Neuro-2a, а затем к мышам, нами выявлено увеличение длины варибельного региона 3'-НТО (рисунок 3.7). Длина этого региона 3'-НТО у исходного штамма С11-13, выделенного от человека составила 107 н., после адаптации на культурах клеток SPEV и Neuro-2a – 144 нуклеотида, а на клетках НЕК 293 – 129 н. Однако, после трех пассажей на мышах было обнаружено увеличение длины варибельного региона 3'-НТО со 144 до 413 нуклеотидов (таблица 3.8). Интересно, что аналогичная длина этого региона была ранее обнаружена в 3'-НТО у штамма Tomsk-PT122 (KM019545), выделенного из садовой камышовки (*Acrocephalus dumetorum*) (Ternovoi et al., 2019), и прошедшего несколько пассажей на клетках SPEV. Предполагается, что замены в 3'-НТО для изолятов ВКЭ человеческого происхождения являются определяющими для репликации ВКЭ в клетках человека.

**Таблица 3.8 Характеристика размеров геномной РНК и 3'-НТО ВКЭ штамма С11-13**

Штамм ВКЭ	Полный геном	Варибельный регион 3'-НТО	Консервативный регион 3'-НТО	Весь регион 3'-НТО
С11-13_1 пассаж на SPEV	10801	107	320	427
С11-13_3 пассаж на SPEV	10838	144	320	464
С11-13_8 пассаж на SPEV (MF043953)	10838	144	320	464
С11-13_Neu (MF043955)	10838	144	320	464
С11-13_293 (MF043954)	10823	129	320	449
С11-13 3-3 (3 пассаж на SPEV → 3 пассаж на мышах)	11107	413	320	733
С11-13 8-3 (8 пассаж на SPEV → 3 пассаж на мышах)	11107	413	320	733
Tomsk-PT122, (KM019545)	10933	413	146	576

**Примечание:** синим цветом обозначен исходный изолят С11-13, выделенный от человека, после первого пассажа на культуре клеток SPEV; серым цветом –

штамм С11-13 ВКЭ, прошедший ряд последовательных пассажей на культуре клеток SPEV, НЕК 293 и Neuro-2a; зеленым – штамм С11-13 адаптированный с культуры клеток SPEV на животных (мышах).

Ранее, было сделано предположение о том, что флавивирусная 3'-НТО может быть подразделена на два функциональных элемента – промотор и энхансер (Gritsun, Gould, 2006a; Gritsun, Gould, 2006c). Промотор содержит область, которая необходима для репликации РНК и поддержания жизнеспособности вируса. Экспериментально установлено, что для группы ВКЭ, он примерно соответствует 3'-LSH-SL2-Y-образной структуре. Главной формирующей составляющей промотора в 3'-НТО является большая стабильная шпилька 3' LSH (рисунок 1.5). Независимо от генотипа ВКЭ, 3' LSH является наиболее консервативной структурой в 3'-НТО. В тоже время, вариабельный район 3'-НТО имеет характерные для разных генотипов различия. На вершине 3' LSH шпильки находится консервативный пентануклеотид (3' CPN) CACAG, известно, что он главным образом влияет на эффективность репликации.

Область между стоп-кодоном и промотором определяется как энхансер, который не является существенным для жизнеспособности вирусов, но участвует в регуляции работы промотора. Энхансер охватывает как консервативную область 3'-НТО, так и вариабельную 3'-НТО. Длина энхансера варьирует между различными штаммами, а также изменяется в процессе адаптации вируса к новым клеткам (рисунок 3.7). А увеличение длины 3'-НТО штамма С11-13 происходит как раз в вариабельном регионе, в области энхансера. Консервативный же район 3'-НТО, который содержит область промотора был одинаков внутри сибирского генотипа ВКЭ. Его вторичная структура в процессе пассирования штамма С11-13 не изменялась и была схожа со штаммами Zausaev, Glubinnoe/2004 и Kolarovo-2008.

По всей вероятности, механизм изменения 3'-НТО принципиально важен для обеспечения эффективной репликации ВКЭ к клеткам различных хозяев при постоянно изменяющихся условиях среды.

Есть предположение, что эволюция 3'-НТО была связана с диверсификацией области промотора/энхансера в качестве механизма адаптации флавивирусов к различным хозяевам (Gritsun, Gould, 2006c). Хотя функция энхансера может быть не критичной для жизнеспособности вируса в экспериментальных условиях, она может сыграть значительную роль в природной среде, где высокие уровни вирусной репликации могут иметь решающее значение для передачи вируса между хозяевами, обеспечивая тем самым их успех и стратегию выживания.

Возможность изменения последовательности варибельного района 3'-НТО ВКЭ при смене хозяина может быть отнесена к стратегии, используемой вирусом для оптимизации способности продуцировать вирусную инфекцию у разных хозяев.

Таким образом, в ходе проделанной работы, было установлено, что при адаптации природного изолята вируса выделенного от человека, к различным клеткам, а также при смене одного хозяина на другого, идет удлинение варибельного региона 3'-НТО. Проведенный анализ 3'-НТО структур ВКЭ, выявил вариации в консервативной и варибельной области, затрагивающие элементы промоторов и энхансеров. Так, в процессе пассирования штамма С11-13, изолированного из мозга человека, на клетках SPEV (клетки свиньи), Neuro-2A (нейроны мыши), 293 (клетки обезьяны) и лабораторных мышках происходит увеличение длины варибельного региона 3'-НТО со 107 н. до 413 н. Анализ 3'-НТО у штаммов прошедших множественные пассажи на культурах клеток, свидетельствует о том, что у них уже сформировались увеличенные структуры варибельной части 3'-НТО, как результат адаптации к лабораторным условиям. При этом, изменчивость 3'-НТО может функционировать как усилитель репликации РНК флавивирусов, обеспечивая стратегию выживаемости флавивирусов у разных хозяев.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ареал ВКЭ в основном совпадает с ареалом обитания клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus* на значительной части северной Евразии. В последние годы заболевания ВКЭ регистрируются даже в неэндемичных по КЭ районах. Так, в странах Балтии и Словении наблюдаются случаи заболевания КЭ почти с такой же частотой, как и в европейской части Российской Федерации. Случаи заболевания клещевым энцефалитом постоянно регистрируются в новых областях в Западной Европе, тем самым демонстрируя формирование природных очагов КЭ в районах, которые ранее считались не эндемичными по КЭ (Caracciolo et al., 2015). Птицы, мелкие млекопитающие и клещи обеспечивают формирование природных очагов КЭ и служат принципиальными хозяевами для ВКЭ. Биологические различия клеток клещей, птиц и млекопитающих очень существенны, как и возможные температурные факторы для обеспечения эффективности репликации ВКЭ в этих типах клеток. Это предполагает, что ВКЭ должен обеспечивать репликацию генома и получение вирусного потомства в клетках различных видов хозяев, в изменяющихся условиях среды.

Обычно иксодовые клещи заражаются ВКЭ после того, как напитаются кровью зараженных птиц или млекопитающих, и в этой цепочке люди участвуют как случайные, промежуточные хозяева, и приобретают ВКЭ уже после адаптации его к клещам. В попытке объяснить репликацию ВКЭ в различных хозяевах (клещи, птицы, пресмыкающиеся и млекопитающие), была выдвинута гипотеза о том, что ВКЭ имеет механизм, позволяющий ему адаптироваться к клеткам различных хозяев. Известно, что ВКЭ может сосуществовать в естественной вирусной популяции в виде вариантов и что быстрая конверсия нейровирулентности во время адаптации вируса от клеща к млекопитающим опосредуется отбором неких вирусных вариантов из гетерогенной популяции (Русек и др., 2008).

Большинство хорошо изученных штаммов ВКЭ были получены в лабораториях с помощью многократных серийных пассажей на перевиваемых клетках или животных, чувствительных к ВКЭ. Но при этом всегда остается

вопрос о том, какие геномные вариации в рамках этих адаптированных лабораторных вариантов ВКЭ произошли (Kaluzova et al., 1994; Романова и др., 2007; Helmová et al., 2020).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при адаптации к новому хозяину изменения преимущественно происходят в неструктурных NS2B/NS3 белках, для которых были описаны мутации вблизи к каталитическим участкам вирусной сериновой протеазы (Потапова и др., 2011; Потапова и др., 2012).

Было установлено, что адаптация к новым хозяевам вызывает точечные мутации белка E, как в природных изолятах вируса (Khasnatinov et al., 2010), так и при адаптации ВКЭ к культурам клеток млекопитающих ВНК-1 (Goto et al., 2003; Mandl et al., 2001). У ВКЭ от больных людей с разными клиническими формами, были выявлены аминокислотные замены в полипротеине, из которых – 4 замены в белках С, Е и NS3 по видимому были наиболее значимыми (Leonova et al., 2013).

Успешность адаптации ВКЭ к изменяющимся условиям обеспечена определенными генетическими механизмами. Одно из возможных предположений говорит о том, что вариабельность нуклеотидной последовательности 5'-НТО может предопределять эффективность репликации ВКЭ в иксодовых клещах и в клетках других видов резервуарных хозяев в природных очагах (Casati et al., 2006). Основой данного предположения служат данные о локализации в 5'-НТО геномной РНК флавивирусов сайтов связывания для вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы и взаимодействия с рибосомами клетки хозяина для обеспечения синтеза вирусного полипротеина.

Анализ нуклеотидной последовательности 5'-НТО геномной РНК ВКЭ выделенной из таежных клещей показал, что этот район вирусного генома весьма вариабелен и содержит как консервативные, так и вариабельные структурные элементы (Chausov et al., 2010; Микрюкова и др., 2014).

Проведенное нами сравнение генетического разнообразия 5'-НТО ВКЭ в природных очагах Западной Сибири, Дальневосточном регионе России и приграничной к России Восточной Европе показало, что наибольшей

вариабельностью отличались элементы В2, С1 и С2 Y-образной структуры 5'-НТО. Нуклеотидные замены, как правило, локализовались в петлевых структурах, не затрагивая шпилечные области 5'-НТО ВКЭ. Полученные нами данные подтверждают идею о том, что вариабельность 5'-НТО ВКЭ отражает особенности строения генома флавивирусов, обеспечивающие эффективность репликации в клетках птиц, млекопитающих и клещей (Chausov et al., 2010; Микрюкова и др., 2014). Обнаруженные множественные нуклеотидные замены в 5'-НТО, по всей вероятности, могут приводить к изменению вторичной структуры РНК 5'-НТО генома ВКЭ, что происходит одновременно с процессом адаптации вируса к новым видам переносчиков и хозяев в природных очагах. Знание и понимание пределов вариабельности вирусного генома принципиально важно как для эффективной диагностики флавивирусных инфекций, так и для совершенствования профилактики и лечения КЭ.

Также, было проведено полногеномное секвенирование изолята ВКЭ, выделенного из мозга погибшего от клещевого энцефалита человека. ВКЭ, в дальнейшем, культивировали путем последовательных пассажей на культуре клеток (SPEV, 293 и Neuro-2a) и мелких млекопитающих (лабораторные мыши). В процессе пассирования на культуре клеток и лабораторных животных были получены быстрорастущие варианты ВКЭ штамма С11-13. Было установлено, что в процессе адаптации ВКЭ С11-13 к новому хозяину, в лабораторных вариантах появляются нуклеотидные и аминокислотные замены в структурных и неструктурных белках вируса, свидетельствующие о существовании достаточно быстрого и эффективного процесса генной изменчивости вирусной микропопуляции, связанного как с адаптацией природного изолята ВКЭ к новому хозяину, так и со сменой одного хозяина на другого (клещ → человек → культура клеток → мышь).

Проведенный анализ 3'-НТО ВКЭ штамма С11-13 выявил изменение длины вариабельной области. Так, в процессе пассирования штамма С11-13 изолированного из мозга человека, на клетках SPEV, Neuro-2A и HEK 293

произошло увеличение длины вариабельного региона 3'-НТО со 107 н. до 144 н., а затем, при пассировании на животных она увеличилась со 144 н. до 413 н. Изменения в последовательности вариабельного района 3'-НТО ВКЭ могут быть отнесены к стратегии, используемой вирусом для оптимизации способности продуцировать вирусную инфекцию у разных хозяев.

Важно отметить, что уточнение ареалов распространения генотипов ВКЭ, изучение вариабельности вирусного генома и биологических свойств ВКЭ принципиально важно, как для улучшения диагностики трансмиссивных инфекций, так и для совершенствования профилактики и лечения КЭ.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые, в регионе юго-восточной Европы на территории Республики Молдова, был обнаружен вирус клещевого энцефалита дальневосточного генотипа у клещей *Ixodes ricinus*, *Dermacentor spp.* и *Haemaphysalis spp.*, собранных с домашних животных и в сельскохозяйственных угодьях.

2. При сравнении генетического разнообразия природных изолятов вируса клещевого энцефалита в Западной Сибири, Дальневосточном регионе России и приграничной к России Восточной Европе, нуклеотидные замены локализовались в петлевых структурах, не затрагивая шпилечные области 5'-НТО вируса клещевого энцефалита. Наибольшей вариабельностью отличались элементы В2, С1 и С2 Y-образной структуры 5'-НТО. Элементы А2, CS\_A, CS\_B и стартовый кодон были консервативными.

3. В процессе адаптации вируса клещевого энцефалита штамма С11-13, выделенного от человека, к новому хозяину (клещ → человек → культура клеток → мышь) в лабораторных вариантах уже после третьего пассажа на клетках выявлены аминокислотные замены в структурных (Е) и неструктурных вирусных белках (NS1, NS2a, NS3 и NS5). Замены в NS1 (N1067D), NS2a (L1168V) и NS3 (H1745Q) были общими для всех использованных в эксперименте культур клеток (SPEV, НЕК 293 и Neuro-2a).

4. В процессе адаптации ВКЭ с культуры клеток на мышах (три пассажа) у вируса появились 6 аминокислотных замен характерных для изолята вируса С11-13, выделенного от человека, но замещенных при последующих пассажах (8 пассажей) на линии клеток почки эмбриона свиньи (SPEV). При адаптации от SPEV к новому хозяину – мышам произошли замещения в белке Е (Q367R), в NS1 (N1067D), в NS3 (R1488Q и D1511N) и в NS5 (M2561K и S2925F).

5. При пассажах вируса клещевого энцефалита штамма С11-13 на клетках SPEV и Neuro 2a к третьему пассажу 3'-НТО увеличилась на 37 нуклеотидов, а на клетка НЕК-293 – на 22 нуклеотида. При адаптации штамма С11-13 ВКЭ с культуры клеток SPEV к мышам, длина вариабельного региона 3'-НТО увеличилась на 269

нуклеотидов. Возможность изменения последовательности переменного региона 3'-НТО вируса клещевого энцефалита при смене хозяина может быть отнесена к стратегии, используемой вирусом для оптимизации способности продуцировать вирусную инфекцию у разных хозяев.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аграновский А.А. Репликация вирусных РНК / Товарищество научных изданий КМК. – Москва, 2019. – 165 с.
2. Алексеева И.С., Сиволобова А.С., Атешев Д.М., Лыков К.А. Особенности строения генома вируса Западного Нила. Роль нетранслируемых фрагментов в геноме // Материалы МСНК "Студенческий научный форум 2022". – 2021. – № 8. – С. 7-9;
3. Аммосов А.Д. Клещевой энцефалит / Информационно-методическое пособие. – Кольцово, 2006. – 115 с.
4. Богачек М.В., Протопопова Е.В., Терновой В.А., Качко А.В., Иванова А.В., Иванисенко В.А., Локтев В.Б. Иммунохимические свойства рекомбинантных полипептидов, моделирующих домены I и II белка E вируса Западного Нила // Мол. Биология. – 2005. – № 39(5). – С. 813-822.
5. Богачек М.В., Протопопова Е.В., Терновой В.А., Качко А.В., Иванова А.В., Иванисенко В. А., Швалов А.Н., Локтев В.Б. Иммунохимические свойства белка РгМ и С-концевого фрагмента белка М вируса Западного Нила // Мол. Биология. – 2007. – № 41(1). – С. 8-17.
6. Верховзина М.М. Молекулярная эпидемиология и экология вируса клещевого энцефалита в Восточной Сибири: дисс. ... д.б.н. – Иркутск, 2014 – 369 с.
7. Воспоминания о Елизавете Николаевне Левкович / отв. ред. проф. В.В. Погодина. – М., 2001. – 201 с.
8. Вотяков В.И., Злобин В.И., Мишаева Н.П. Клещевые энцефалиты Евразии. – Новосибирск: Наука, 2002. – 438 с.
9. Гайдамович С.Я. Клещевой энцефалит // Здоровье населения и среда обитания. – 1996. – № 4. – С. 19-22.
10. Герасимов С.Г. Эволюция клещевого энцефалита в Центральном федеральном округе России. Моделирование смены подтипов

- возбудителя в эксперименте: дисс. ... канд. мед. наук: 03.02.02 – М., 2012. – 212 с.
11. Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Козлова И.В., Верховина М.М., Ткачев С.Е., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Парамонов А.И., Злобин В.И. Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования // Вопросы вирусологии. – 2012. – № 57(4). – С.13-18.
  12. Джигоев Ю.П., Ткачев С.Е., Карань Л.С., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Сунцова О.В., Парамонов А.И., Черноиванова О.О., Ревизор А.О., Злобин В.И., Козлова И.В., Верховина М.М., Демина Т.В. Комплексная характеристика оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных на территории Восточной Сибири // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – № 111(4). – С. 80-85.
  13. Ефимова А.Р., Карань Л.С., Дроздова О.М., Григорьева Я.Е., Фролова Н.А., Шейдерова И.Д., Безрукова Е.Г., Колясникова Н.М., Щербинина М.С., Погодина В.В. Современная эпидемиологическая ситуация по клещевому энцефалиту и генетическое разнообразие ВКЭ на территории Кемеровской области // Медицинская вирусология. – 2015. – № 29(1). – С. 3-15.
  14. Злобин В.И. Клещевой энцефалит в Российской Федерации: этиология, эпидемиология и стратегия профилактики // Terra medica nova. – 2010. – № 2(61). – С. 13-21.
  15. Злобин В.И., Верховина М.М., Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Адельшин Р.В., Козлова И.В., Беликов С.И., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Исаева Е.И., Гришечкин А.Е. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. – 2007. – № 6. – С. 4-13.
  16. Карань Л.С., Браславская С.И., Мязин А.Е. Развитие методов детекции и генотипирования вируса клещевого энцефалита на основе

- амплификационных технологий // Вопросы вирусологии. – 2007. – № 6. – С. 17-22.
17. Карань Л.С., Погодина В.В., Фролова Т. В., Платонов А.Е. Генетические различия восточноевропейской и азиатской популяции вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – № 5(51). – С. 24-27.
18. Карпов С.П. Томский очаг КЭ и вопросы его оздоровления // В кн.: Клещевой энцефалит. – Минск, 1965. – С. 212-221.
19. Карпова М.Р., Воробьева М.С., Куш А.А., Киселева Н.Н., Расщепкина М.Н., Ладыженская И.П., Мельникова Е.Э., Шпилева М.В., Атанадзе С.Н., Ворович М.Ф., Федоров Ю.В. Анализ стабильности некоторых свойств вируса клещевого энцефалита (штамм 205) при пассировании на мышах // Вопросы вирусологии. – 1995. – №5. – С. 205-208.
20. Ковалев С. Ю., Мухачева Т. А. Проблема «смены» генотипа вируса клещевого энцефалита на Урале за последние 60 лет // Национальные приоритеты России «Актуальные проблемы природной очаговости болезней». – 2011. – № 2(5). – С. 151-153.
21. Козлова И. В., Верховина М. М., Демина Т. В. Джигоев Ю.П. Ткачев С.Е. Карань Л.С., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Сунцова О.В. Парамонов А.И., Черноиванова О.О., Ревизор А.О., Злобин В.И. Генетические и биологические свойства оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, циркулирующего в Восточной Сибири // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2012. – № 3(64). – С. 14-25.
22. Козлова И.В., Демина Т.В., Ткачев С.Е., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Верховина М.М., Карань Л.С., Джигоев Ю.П., Парамонов А.И., Сунцова О.В., Савинова Ю.С., Черноиванова О.О., Ruzek D., Тикунова Н.В., Злобин В.И. Характеристика байкальского субтипа вируса клещевого энцефалита, циркулирующего на территории Восточной Сибири // Acta Biomedica Scientifica. – 2018. – № 3(4) – С. 53-60.

23. Колясникова Н. М. Мониторинг структуры популяции вируса клещевого энцефалита в Уральском, Западно-Сибирском и Северо-западном регионах России (вирусологические и молекулярно-биологические исследования): дисс. ... канд. мед. наук: 03.02.02 – М., 2008. – 216 с.
24. Колясникова Н. М., Герасимов С. Г., Ишмухаметов А. А., Погодина В.В. Эволюция клещевого энцефалита за 80-летний период: основные проявления, вероятные причины // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2020. – № 19(3). – С. 78-88.
25. Коренберг Э. И., Горелова Н. Б., Ковалевский Ю. В. Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов в России // Паразитология. – 2002. – № 36(3). – С. 177-191.
26. Курчаков А.Л., Цкаррозия Е.Г. Эпидемиологическая ситуация клещевого вирусного энцефалита в европейской части России. Профилактика и лечение / В сборнике: Актуальные вопросы науки и практики. Сборник научных статей по материалам IV Международной научно-практической конференции. – Уфа, 2021. – С. 244-248.
27. Леонова Г.В. Клещевой энцефалит в Приморском крае. – Владивосток: Дальнаука, 1997. – 187 с.
28. Леонова Г.Н., Исачкова Л.М., Кругляк С.П., Майстровская О.С. Патогенетические критерии оценки вирулентности штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных на юге Дальнего Востока // Вопросы вирусологии. – 1995. – № 4. – С. 165-169.
29. Леонова Г.Н., Майстровская О.С., Борисевич В.Б. Антигенемия у людей, инфицированных вирусом клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. – 1996. – № 6. – С. 260-263.
30. Лесникова М.В., Колясникова Н.М., Смелков С.Н. Эпидемиологическая ситуация по клещевому энцефалиту в

Вологодской области на современном этапе // Медицинская вирусология. – 2015. – № 29. – С. 94.

31. Липин С. И., Жезмер В. Ю. К вопросу об эволюции природных очагов клещевого энцефалита в Восточной Сибири (Предбайкалье). В кн.: Природно-очаговые инфекции в районах народнохозяйственного освоения Сибири и Дальнего Востока. – Омск: Омский мед. институт, 1983. – С. 36-40.
32. Локтев В.Б., Терновой В.А., Нетесов С.В. Молекулярно генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. – 2007. – № 52. – С. 10-16.
33. Львов Д.К. Лихорадка Западного Нила // Вопросы вирусологии. – 2000. – №45(2). – С.4-9.
34. Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Трушина Ю.Н., Сидорова Е.А., Худченко С.Э., Андаев Е.И., Галацевич Н.Ф., Чумаков А.В., Чумакова Н.А., Лесных С.И. Обследование территории республики Тыва на некоторые природно-очаговые инфекции // Инфекционные болезни. – 2014. – № 12(4). – С. 48-55.
35. Микрюкова Т.П., Чаусов Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Протопопова Е.В., Карташов М.Ю., Терновой В.А., Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Локтев В.Б. Генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита в клещах *Ixodes persulcatus* в Северо-Восточном регионе европейской части России // Паразитология. – 2014. – № 48. – С. 131-149.
36. Монастырская Г.С., Костина М.Б., Филюкова О.Б., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Качко А.В., Николаев Л.Г., Локтев В.Б., Свердлов Е.Д. Активация гена RIG-I, кодирующего DEхН/D-белок, при инфекции клеток RH вирусом клещевого энцефалита // Биоорганическая химия. – 2004. – №30(2). – С. 146-150.

37. Морозова О.В. Свойства некоторых белков вируса клещевого энцефалита: дис. ... докт. биол. наук: 03.00.06 – Кольцово, 2001. – 216 с.
38. Морозова О.В., Бахвалова В.Н. Природные циклы и клещевой энцефалит // В мире научных открытий. – 2010. – № 2-1(8). – С.31-37.
39. Морозько П.Н., Галустян А.О. Об эпидемиологической ситуации по инфекциям, передающимся клещами, в российской федерации / Сборник научных трудов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Актуальные вопросы гигиены. – 2021. – С. 245-252.
40. О результатах мониторинга за эпидемиологической ситуацией по инфекциям, передающимся иксодовыми клещами, в эпидемический сезон 2021 года. – 2021. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news> (дата обращения: 16.12.2021).
41. Погодина В. В., Карань Л. С., Колясникова Н. М. Политиповые штаммы в генофонде вируса клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. – 2012. – № 3. – С. 30-36.
42. Погодина В. В., Карань Л. С., Колясникова Н. М., Левина Л. С., Маленко Г.В., Гамова Е.Г., Лесникова М.В., Килячина А.С., Есюнина М. С, Бочкова Н.Г., Шопенская Т.А., Фролова Т.В., Андаев Е.И., Трухина А.Г. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя // Вопросы вирусологии. – 2007. – № 52(5). – С. 16-21.
43. Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. Хронический клещевой энцефалит. – Новосибирск: Наука, 1986. – 232 с.
44. Потапова У.В., Романова Е.В., Потапов В.В., Кулакова Н.В., Леонова Г.Н., Феранчук С.И., Беликов С.И. Анализ мутаций и молекулярное моделирование комплекса сериновой протеазы NS2b-NS3 вируса клещевого энцефалита // Биллетень ВСНЦ СО РАН. – 2011. – № 1 (77). – С. 239-244.

45. Потапова У.В., Феранчук С.И., Потапов В.В., Кулакова Н.В., Кондратов И.Г., Леонова Г.Н., Беликов С.И. Протеаза NS2B/NS3: аллостерический эффект мутаций, связанных с патогенностью вируса клещевого энцефалита // Биомолекулярная структура. – 2012. – № 30(6). – С. 638-51.
46. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных: ввод. в действие с 12.08.1977 г. приказом Министерства здравоохранения СССР № 755 "О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных". Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов [<https://docs.cntd.ru/document/456016716>].
47. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. – Перевод с английского. – Washington D.C. – National Academy Press, 1996. – 138 с.
48. Субботина Е.Л., Локтев В.Б. Молекулярная эволюция вируса клещевого энцефалита и вируса Повассан // Молекулярная биология. – 2012. – Т. 46. № 1. – С. 82-92.
49. Тикунова Н.В., Власов В.В., Рар В.А., Ткачев С.Е. Клещи, которые нас кусают // Наука из первых рук. – 2019. – № 5-6 (85). – С. 32-51.
50. Утенкова Е.О., Савиных Н.А. Клещевой энцефалит в России и Европе (ОБЗОР) // Медицинский альманах. – 2021. – № 2(67). – С. 13-21.
51. Хаснатинов М. А., Данчинова Г. А., Кулакова Н. В.,Tungalag К., Арбатская Е. В., Миронова Л. В., Tserenborov D., Volormaa G., Otgonbaatar D., Злобин В. И. Генетическая характеристика возбудителя клещевого энцефалита в Монголии // Вопросы вирусологии. – 2010. – № 3. – С. 27-32.

52. Хозинская Г.А., Чунихин С.П. Изменчивость арбовирусов при репродукции в переносчиках, культурах их клеток и тканей // Мед. паразитология. – 1988. – №3. – С.3-8.
53. Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю. В., Тупота Н. Л., Москвитина Н. С., Романенко В. Н., Иванова Н. В., Большакова Н. П., Леонова Г. Н., Локтев В. Б. Молекулярно-генетический анализ полного генома вируса клещевого энцефалита сибирского субтипа на примере современного изолята Коларово-2008 // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 110. – С. 44-48.
54. Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Леонова Г.Н., Локтев В.Б. Молекулярно-генетический анализ генома высокопатогенного штамма Глубинное/2004 вируса клещевого энцефалита // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – № 3. – С. 27-30.
55. Alley R.B., Andrews J., Brigham Grette J.T.A.J., Clarke G.K.C., Cuffey K., Fitzpatrick J., Funder S., Marshall S., Miller G., Mitrovica J., Muhs D., Otto-Bliesner B., Polyak L., White J.W. C. History of the Greenland Ice Sheet: paleoclimatic insights // Quaternary Science Reviews. – 2010. – V. 29. – P. 1728-1756.
56. Allison S.L., Schalich J., Stiasny K., Mandl C.W., Kunz Ch., Heinz F.X. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH // Journal of Virology. - 1995. – V. 69. – P. 695-700.
57. Allison S.L., Schalich J., Stiasny K., Mandl C.W., Heinz F.X. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. // Journal of Virology. – 2001. – V. 75(9). – P. 4268-4275.
58. Alvarez D.E., Filomatori C.V., Gamarnik A.V. Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3' UTRs // Virology. – 2008. – V. 375. – P. 223-235.

59. Alvarez D.E., Lodeiro M.F., Luduena J, Pietrasanta L.I., Gamarnik A.V. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome // *Journal of Virology*. – 2005. – V. 79. – P. 6631-6643.
60. Amberg S.M., Nestorowicz A., McCourt D.W., Rice C . NS2B-3 proteinase-mediated processing in the yellow fever virus structural region: in vitro and in vivo studies // *Journal of virology*. – 1994. – V. 68(6). – P. 3794-3802.
61. Andrade C.C., Young K.I., Johnson W.L., Villa M.E., Buraczyk C.A., Messer W.B., Hanley K.A. Rise and fall of vector infectivity during sequential strain displacements by mosquito-borne dengue virus // *Journal of Evolutionary Biology*. – 2016. – V. 29. – P. 2205-2218.
62. Arias C.F., Preugschat F., Strauss J.H. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain // *Virology*. – 1993. – V. 193(2). – P. 888-899.
63. Bakhvalova V.N., Chicherina G.S., Potapova O.F., Panov V.V., Glupov V.V., Potapov M.A., Seligman S.J., Morozova O.V. Tick-Borne Encephalitis Virus Diversity in Ixodid Ticks and Small Mammals in South-Western Siberia, Russia // *Vector borne and zoonotic diseases*. – 2016. – V. 16(8). – P. 541-549.
64. Batschelet E., Domingo E., Weissmann C. The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate // *Gene* – 1976. – V. 1(1) – P. 27-32.
65. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties // *PLOS ONE*. – 2014. – V. 9(4). – e94946.
66. Bhatt S., Gething P.W., Brady O.J., Messina J.P., Farlow A.W., Moyes C.L., Drake J.M., Brownstein J.S., Hoen A.G., Sankoh O., Myers M.F., George D.B., Jaenisch T., Wint G.R., Simmons C.P., Scott T.W., Farrar J.J., Hay S.I. The global distribution and burden of dengue // *Nature*. – 2013. – V. 496. – P. 504-507.

67. Bidet K., Dadlani D., Garcia-Blanco M.A. G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA // *PLoS Pathogens*. – 2014. – V. 10. – e1004242.
68. Billoir F., De Chesse R., Tolou H., De Micco P., Gould E. A., De Lamballerie X. Phylogeny of the genus *Flavivirus* using complete coding sequences of arthropod-borne viruses and viruses with no known vector // *Journal of General Virology*. – 2000. – V. 81. – P. 781-790.
69. Bogovic P., Strle F. Tick-borne encephalitis: a review of epidemiology, clinical characteristics, and management // *World journal of clinical cases*. – 2015. – V. 3(5). – P. 430-441.
70. Brackney D.E., Beane J.E., Ebel G.D. RNAi targeting of West Nile virus in mosquito midguts promotes virus diversification // *PLoS Pathogens*. – 2009. – V. 5. – e1000502.
71. Bredenbeek P.J., Kooi E.A., Lindenbach B., Huijkman N., Rice C.M., Spaan W.J. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication // *Journal of general virolog.* – 2003. – V. 84(5). – P. 1261-1268.
72. Brinton M.A., Miller W.A. Positive strand RNA virus replication: it depends on the ends // *Virus Research*. – 2015. – V. 206. – P. 1-2.
73. Burke D.S., Monath T.P. *Flavivirus* / In: Knipe D.M. and Howley P.M., Eds. // *Field Virology*. – 4th Edition, Lippincott Williams & Wilkins. – Philadelphia. – 2001. – P. 852-921.
74. Bustos-Arriaga J., Gromowski G.D., Tsetsarkin K.A., Firestone C-Y., CastroJiménez T., Pletnev A.G., Cedillo-Barrón L., Whitehead SS. Decreased accumulation of subgenomic RNA in human cells infected with vaccine candidate DEN4Delta30 increases viral susceptibility to type I interferon // *Vaccine*. – 2018. – V. 36. – P. 3460 -3467.

75. Cahour A., Pletnev A., Vazielle Falcoz M., Rosen L., Lai C.J. Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 50 noncoding region of the RNA genome // *Virology*. – 1995. – V. 207(1). – P. 68-76.
76. Calisher C.H., Karabatsos N., Dalrymple J.M., Shope R.E., Porterfield J.S., Westaway E.G., Brandt W.E. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera // *Journal of general virology*. – 1989. – V.70(1). – P. 37-43.
77. Caracciolo I., Bassetti M., Paladini G., Luzzati R., Santon D., Merelli M., Sabbata G.D., Carletti T., Marcell, A., D'Agaro P. Persistent viremia and urine shedding of tick-borne encephalitis virus in an infected immunosuppressed patient from a new epidemic cluster in north-eastern Italy // *Journal of clinical virology*. – 2015. – V. 69. – P. 48-51.
78. Casati S., Gern L., Pifaretti J.-C. Diversity of the population of tick-borne encephalitis virus infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern) // *Journal of general virology*. – 2006. – V. 87(8). – P. 2235-2241.
79. Chambers T. J., Hahn C. S., Galler R. & Rice C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication // *Annual Review of Microbiology*. – 1990. – V.44. – P. 649-688.
80. Chapman E.G., Moon S.L., Wilusz J., Kieft J.S. RNA structures that resist degradation by Xrn1 produce a pathogenic dengue virus RNA // *eLife*. – 2014. – V. 3. – e01892.
81. Chausov E.V., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Konovalova S.N., Kononova Iu.V., Pershikova N.L., Moskovitina N.S., Romanenko V. N., Ivanova N.V., Bol'shakova N. P., Moskvitin S. S., Korobitsyn I.G., Gashkov S. I., Tiuten'kov O. I., Kuranova V. N., Kravchenko L. B., Suchkova N. G., Agulova L.P., Loktev V.B. Genetic diversity of ixodid tick-borne pathogens in Tomsk City and suburbs // *Parazitologiya*. – 2009. – V. 43(5). – P. 374-88 (in Russian).

82. Chausov E.M., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Kononova J.V., Konovalova S.N., Pershikova N.L., Loktev V.B., Romanenko V.N., Ivanova N.V., Bolshakova N.P., Moskvitina N.S. Variability of the tick-borne encephalitis virus genome in the 5' noncoding region derived from ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* in Western Siberia // *Vector-borne Zoonotic Diseases*. – 2010. – V. 10. – P. 365-375.
83. Chen R., Wang E., Tsetsarkin K. A., Weaver S.C. Chikungunya virus 3' untranslated region: adaptation to mosquitoes and a population bottleneck as major evolutionary forces // *PLoS Pathogens*. – 2013. – V. 9. – e1003591.
84. Chicu V., Gheorghijă S. D., Gori A.V, Ternovoi V. A, Burlacu V. I. The diversity of causative agent of infectious diseases identified in ticks population collected in the Republic of Moldova // *Public Health, Economics and Management*. – 2013. –V. 2 (47). –P. 60-4 (in Moldavian).
85. Choi K.H. The Role of the Stem-Loop A RNA Promoter in Flavivirus Replication // *Viruses*. – 2021. – V. 13. – P. 1107. <https://doi.org/10.3390/v13061107>
86. Chua K., Bellini W., Rota P., Harcourt B., Tamin A., Lam S., Ksiazek T., Rollin P., Zaki S., Shieh W., Goldsmith C., Gubler D., Roehrig J., Eaton B., Gould A., Olson J., Field H., Daniels P., Ling A., Peters C., Anderson L., Mahy B. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus // *Science*. – 2000. – V. 288. – P. 1432-1435.
87. Ciota A.T., Ehrbar D.J., Slyke G.A., Payne A.F., Willsey G.G., Viscio R.E., Kramer L.D. Quantification of intrahost bottlenecks of West Nile virus in *Culex pipiens* mosquitoes using an artificial mutant swarm // *Infection, Genetics and Evolution* – 2009. – V. 6 (3). – P. 247-253.
88. Ciota A.T., Kramer L.D. Insights into arbovirus evolution and adaptation from experimental studies // *Viruses* – 2010. – V. 2(12) – P. 2594-2617.

89. Clarke D. Studies on antigenic relationships among the viruses of the group B tick-borne complex // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1964. – V. 31. – P. 45-56.
90. Clarke B.D., Roby J.A., Slonchak A., Khromykh A.A. Functional noncoding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region // *Virus Res*. – 2015. – V. 206. – P. 53-61.
91. Colombage G., Hall R., Pavy M., Lobigs M. DNA-based and alphavirus-vectored immunisation with prM and E proteins elicits long-lived and protective immunity against the flavivirus, Murray Valley encephalitis virus // *Virology*. – V. 250(1). – 1998. – P. 151-163.
92. Crill W.D., Wichman H.A., Bull J.J. Evolutionary reversals during viral adaptation to alternating hosts // *Genetics*. – 2000. – V. 154 (1). – P. 27-37.
93. Dai X., Shang G., Lu S., Yang J., Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China // *Emerg Microbes Infect.* – 2018. – V. 7(1). – P. 74.
94. Davis C.W., Mattei L.M., Nguyen H.Y., Ansarah-Sobrinho C., Doms R. W., Pierson T. C. The location of asparagine-linked glycans on West Nile virions controls their interactions with CD209 (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) // *J Biol Chem*. – 2006. – V. 281(48). – P. 37183-37194.
95. Davies T.J., Pedersen A.B. Phylogeny and geography predict pathogen community similarity in wild primates and humans // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2008. – V. 275. – P. 1695-1701.
96. de Borba L., Villordo S.M., Iglesias N.G., Filomatori C.V., Gebhard L.G., Gamarnik A.V. Overlapping local and long-range RNA-RNA interactions modulate dengue virus genome cyclization and replication // *Journal of Virology*. – 2015. – V. 89. P. 3430-3437.

97. Domingo E., Sheldon J., Perales C. Viral Quasispecies Evolution // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2012. – V. 76(2). – P. 159-216.
98. Durbin A.P., Karron R.A., Sun W., Vaughn D.W., Reynolds M.J., Perreault J.R., Thumar B., Men R., Lai C.J., Elkins W.R., Chanock R.M., Murphy B.R., Whitehead S.S. Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region // *American journal of tropical medicine and hygiene*. – 2001. – V. 65(5). – P. 405-413.
99. Engelstadter J., Hurst G.D. The dynamics of parasite incidence across host species // *Evolutionary Ecology*. – 2006. – V. 20(6). – P. 603- 616.
100. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*. – 1985. – V. 39. – P. 783-791.
101. Filomatori C.V., Carballeda J.M., Villordo S.M., Aguirre S., Pallares H.M., Maestre A.M., Sanchez-Vargas I., Blair C.D., Fabri C., Morales M.A., Fernandez-Sesma A., Gamarnik A.V. Dengue virus genomic variation associated with mosquito adaptation defines the pattern of viral non-coding RNAs and fitness in human cells // *PLoS Pathogens*. – 2017. – V. 13. – e1006265.
102. Filomatori C.V., Lodeiro M.F., Alvarez D.E., Samsa M.M., Pietrasanta L., Gamarnik A.V. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome // *Genes Dev*. – 2006. – V. 20. – P. 2238-2249.
103. Flamand M., Megret F., Mathieu M., Lepault J., Rey F.A., Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion // *Journal of Virology*. – 1999. – V. 73(7). – P. 6104-6110.
104. Fontaine A., Lequime S., Moltini-Conclois I., Jiolle D., Leparac-Goffart I., Reiner R.C., Jr, Lambrechts L. Epidemiological significance of dengue virus

- genetic variation in mosquito infection dynamics // *PLoS Pathogens*. – 2018. – V. 14. – e1007187.
105. Formanova P., Cerny J., Bolfikov B.C., Valdes J.J., Kozlova I., Dzhioev Y., Ruzek D. Full genome sequences and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus strains isolated from human patients // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2015. – V. 6(1). – P. 38-46.
106. Friebe P., Shi P.Y., Harris E. The 5' and 3' downstream AUG region elements are required for mosquito-borne flavivirus RNA replication // *Journal of Virology*. – 2011. – V. 85. – P. 1900-1905.
107. Friedrich S., Engelmann S., Schmidt T., Szczepankiewicz G., Bergs S., Liebert U.G., Kummerer B.M., Golbik R.P., Behrens S.E. The host factor AUF1 p45 supports flavivirus propagation by triggering the RNA switch required for viral genome cyclization // *Journal of Virology*. – 2018. – V. 92. – e01647-17.
108. Friedrich S., Schmidt T., Geissler R., Lilie H., Chabierski S., Ulbert S., Liebert U.G., Golbik R.P., Behrens S.E. AUF1 p45 promotes West Nile virus replication by an RNA chaperone activity that supports cyclization of the viral genome // *Journal of Virology*. – 2014. – V. 88. – P. 11586-11599.
109. Funk A., Truong K., Nagasaki T., Torres S., Floden N., Balmori Melian E., Edmonds J., Dong H., Shi P.Y., Khromykh A.A. RNA structures required for production of subgenomic flavivirus RNA // *Journal of Virology*. – 2010. – V. 84. – P. 11407-11417.
110. Furuse Y., Suzuki A., Oshitani H. Origin of measles virus: divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries // *Virology Journal*. – 2010. – V. 7. – P. 52.
111. Goertz G.P., Fros J.J., Miesen P., Vogels C.B., van der Bent M.L., Geertsema C., Koenraadt C.J., van Rij R.P., van Oers M.M., Pijlman G.P. Noncoding subgenomic flavivirus RNA is processed by the mosquito RNA interference machinery and determines West Nile virus transmission by

- Culex pipiens* mosquitoes // *Journal of Virology*. – 2016. – V. 90. – P. 10145-10159.
112. Gorbalenya A.E., Koonin E.V., Donchenko A.P., Blinov V.M. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes // *Nucleic acids research*. – 1989. – V. 17(12). – P. 4713-4730.
113. Gorbalenya A.E., Donchenko A.P., Koonin E.V., Blinov V.M. N-terminal domains of putative helicases of flavi-and pestiviruses may be serine proteases // *Nucleic acids research*. – 1989. – V. 17. – P. 3889-3897.
114. Goto A., Hayasaka D., Yoshii K., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I. A BHK-21 cell culture-adapted tick-borne encephalitis virus mutant is attenuated for neuroinvasiveness // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21 (25-26). – P. 4043-4051.
115. Grard G., Moureau G., Charrel R.N., Lemasson J.J., Gonzalez J.P., Gallian P., Gritsun T.S., Holmes, E.C., Gould E.A., de Lamballerie X. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy // *Virology*. – 2007. – V. 361(1). – P. 80-92.
116. Gritsun T. S., Frolova T. V., Zhankov A. I., Armesto M., Turner S. L., Frolova M. P., Pogodina V. V., Lashkevich V. A., Gould E. A. Characterization of a Siberian Virus Isolated from a Patient with Progressive Chronic Tick-Borne Encephalitis // *Journal of Virology*. – 2003. – V. 77(1). – P. 25-36.
117. Gritsun T.S., Gould E.A. The 3' untranslated region of tick-borne flaviviruses originated by the duplication of long repeat sequences within the open reading frame // *Virology*. – 2006a. – V. 350(2). – P. 269-275.
118. Gritsun T.S., Gould E.A. The 3' untranslated regions of Kamiti River virus and cell fusing agent virus originated by self-duplication // *Journal of general virology*. – 2006b. – V. 87.– P. 2615-2619.

119. Gritsun T.S., Gould E.A. Direct repeats in the 3' untranslated regions of mosquito-borne flaviviruses: possible implications for virus transmission // *Journal of general virology*. – 2006c. – V. 87. – P. 3297-3305.
120. Gritsun T.S., Gould E.A. Origin and evolution of 3'UTR of flaviviruses: long direct repeats as a basis for the formation of secondary structures and their significance for virus transmission // *Advances in virus research*. – 2007. – V. 69. – P. 203-248.
121. Gritsun T.S., Gould E.A. Direct repeats in the flavivirus 3' untranslated region; a strategy for survival in the environment // *Virology*. – 2007a. – V. 358. – P. 258-265.
122. Gritsun T.S., Gould E.A. Origin and evolution of flavivirus 5' UTRs and panhandles: trans-terminal duplications? // *Virology*. – 2007b. – V. 366. – P. 8-15.
123. Gritsun D.J., Jones I.M., Gould E.A., Gritsun T.S. Molecular archaeology of Flaviviridae untranslated regions: duplicated RNA structures in the replication enhancer of flaviviruses and pestiviruses emerged via convergent evolution // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – e92056.
124. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis // *Antiviral research*. – 2003a. – V.57(1-2). – P. 129-146.
125. Gritsun T.S., Nuttall P.A., Gould E.A. Tick-borne flaviviruses // *Advances in virus research*. – 2003b. – V. 61. – P. 317-371.
126. Gritsun T.S., Tuplin A.K., Gould E.A. Origin, evolution and function of flavivirus RNA in untranslated and coding regions: implications for virus transmission / In: *Flaviviridae: Pathogenesis, Molecular Biology and Genetics*. Edited by Kalitzky M., Borowski P. – Norwich, UK: Horizon Scientific Press., 2006. – P. 47-99.
127. Hall R.A., Scherret J.H., Khromykh T.I., MacKenzie J.S., Khromykh A.A., MacKenzie J.M. Loss of dimerisation of the nonstructural protein NS1 of

- Kunjin virus delays viral replication and reduces virulence in mice, but still allows secretion of NS1 // *Virology*. – 1999. – V. 264. –P. 66-75.
128. Hapuarachchi H.C., Chua R.C., Shi Y., Thein T.L., Lee L.K., Lee K.S., Lye D.C., Ng L.C., Leo Y.S. Clinical Outcome and Genetic Differences within a Monophyletic Dengue Virus Type 2 Population // *PLoS One* . – 2015. – V. 10(3). – e0121696.
129. Hayasaka D., Goto A., Yoshii K., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I. Evaluation of European tick-borne encephalitis virus vaccine against recent Siberian and far-eastern subtype strains // *Vaccine*. – 2001. – V. 19(32). – P. 4774-4779.
130. Hayasaka D., Gritsun T.S., Yoshii K., Ueki T., Goto A., Mizutani T., Kariwa H., Iwasaki T., Gould E.A., Takashima I.J. Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus // *Journal of general virology*. – 2004. – V. 85(4). – P. 1007-1018.
131. Hayasaka D., Ivanov L., Leonova G.N., Goto A., Yoshii K., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I. Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia // *Journal of general virology*. – 2001. – V. 82(6). – P. 1319-1328.
132. Hayasaka D., Suzuki Y., Kariwa H., Ivanov L., Volkov V. I., Demenev V. A., Mizutani T., Gojobori T., Takashima I. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-eastern Russia // *Journal of general virology*. – 1999. – Vol. 80(12). – P. 3127-3135.
133. Heinz F.X., Allison S.L. Flavivirus structure and membrane fusion // *Advances in virus research*. – 2003. – V. 59. – P. 63-97.
134. Heinz F.X., Mandl C.W. The molecular biology of tick-borne encephalitis virus // *APMIS*. – 1993. – V. 101. – P. 735-745.

135. Helmová R., Hönig V., Tykalová H., Palus M., Bell-Sakyi L., Grubhoffer L. Tick-Borne Encephalitis Virus Adaptation in Different Host Environments and Existence of Quasispecies // *Viruses*. – 2020. – V.12. – P. 902.
136. Hilgenfeld R. Zika virus NS1, a pathogenicity factor with many faces // *The EMBO Journal*. – 2016. – V. 35. – 2631-2633.
137. Holmes E.C., Moya A. Is the Quasispecies Concept Relevant to RNA Viruses? // *Journal of Virology* – 2002. – V. 76(1). – P. 460-462.
138. Holzmann H., Stiasny K., Ecker M., Kunz C., Heinz F.X. Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice // *J. Gen. Virology*. – 1997. – V. 78. – P. 31-37.
139. Hui D.S., Azhar E.I., Madani T.A., Ntoumi F., Kock R., Dar O., Ippolito G., McHugh T.D., Memish Z.A., Drosten C., Zumla A., Petersen E. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - the latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – V. 91. – 2020. – P. 264-266.
140. Iglesias N., Byk L., Gamarnik A. Molecular biology of dengue virus. – 2014. – P. 334- 364. In: Gubler D.J., Ooi E.E., Vasudevan S., Farrar J. (ed). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, 2nd ed. – CABI, Wallingford, United Kingdom, 2019. – V. 10 (1). – e02506-18.
141. Iurchenko O.A., Vinograd N.A., Dubina D.A. Molecular genetic characteristics of tick-borne encephalitis virus in the Crimea // *Voprosy virusologii*. – 2012. – V. 57(3). – P. 40-3 (in Russian).
142. Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of protein molecules. In: Munro H.N.(eds) *Mammalian Protein Metabolism*. – Academic Press, New York, 1969. – V. 3. – P. 21-132.
143. Khasnatinov M.A., Danchinova G.A., Kulakova N.V., Tungalag K., Arbatskaia E.V. a Mironova L.V., Tserennorov D., Bolormaa G.,

- Otgonbaatar D., Zlobin V. I. Genetic characteristics of the causative agent of tick-borne encephalitis in Mongolia // *Voprosy virusologii*. – 2010. – Vol. 55 (3). – P. 27-32.
144. Kaluzova M., Eleckova E., Zuffova E., Pastorek J., Kaluz S., Kozuch O., Labuda M. Reverted virulence of attenuated tick-borne encephalitis virus mutant is not accompanied with the changes in deduced viral envelope protein amino acid sequence // *Acta virologica*. – 1994. – V. 38(3). – P. 133-140.
145. Khasnatinov M.A., Tuplin A., Gritsun D.J., Slovak M., Kazimirova M., Lickova M., Havlikova S., Klempa B., Labuda M., Gould E.A., Gritsun T.S. Tick-Borne Encephalitis Virus Structural Proteins Are the Primary Viral Determinants of Non-Viraemic Transmission between Ticks whereas Non-Structural Proteins Affect Cytotoxicity // *PLoS One*. – 2016. – 11(6). – e0158105. doi: 10.1371/journal.pone.0158105. eCollection 2016.
146. Khasnatinov M.A., Ustanikova K., Frolova T.V., Pogodina V.V., Bochkova N.G., Levina L.S., Slovak M., Kazimirova M., Labuda M., Klempa B., Eleckova E., Gould E.A., Gritsun T.S. Non-hemagglutinating flaviviruses: Molecular mechanisms for the emergence of new strains via adaptation to European tick // *PLoS ONE* – 2009. – V. 4. – P. 1-11.
147. Khromykh A.A., Kondratieva N., Sgro J-Y., Palmenberg A., Westaway E.G. Significance in replication of the terminal nucleotides of the flavivirus genome // *J. Virol.* – 2003. – V.7(19). – P. 10623-10629.
148. Khromykh A.A., Meka H., Guyatt K.J., Westaway E.G. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication // *J Virol.* – 2001. – V. 75(14). – P. 6719-6728.
149. Khromykh A.A., Sedlak P.L., Westaway E.G. Cis-and trans-acting elements in flavivirus RNA replication // *J. Virol.* – 2000. – V. 74. – P. 3253-3263.

150. Khromykh A.A., Westaway E.G. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: Construction and applications // *J Virol.* – 1997. – V. 71.– P. 1497-1505.
151. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *Journal of Molecular Evolution.* – 1980. – V. 16. – P. 111-120.
152. Knap N., Korva M., Dolinsek V., Sekirnik M., Trilar T., Avsic-Zupanc T. Patterns of tick-borne encephalitis virus infection in rodents in Slovenia // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* – 2012. – V. 12(3). – P. 236-242.
153. Knipe D. M., Howley P. M. *Fields virology.* – Philadelphia, PA: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins Health, 2013. – 2664 p.
154. Koonin E.V. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus // *Journal of general virology.* – 1993. – V. 74(4). – P. 733-740.
155. Korenberg E.I., Kovalevskii Yu.V., Karavanov A.S., Moskvitina G.G. Mixed infection by tick-borne encephalitis virus and *Borrelia* in tick // *Medical and veterinary entomology.* – 1999. – V. 13. – P. 204-208.
156. Kovalev S.Y., Kokorev V.S., Belyaeva I.V. Distribution of Far-Eastern tick-borne encephalitis virus subtype strains in the former Soviet Union // *Journal of general virology.* – 2010. – V. 91(12). –P. 2941-29466.
157. Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A. Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history // *Infect Genet Evol.* – 2017. – C. 159-165.
158. Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Shevtsova A.S., Romanova L.Iu., Rogova Y.V., Dzhivanian T.I., Lyapustin V.N., Pivanova G.P., Gmyl A.P., Palyulin V.A., Karganova G.G. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus // *Virology.* – 2010. – V. 398(2). – P. 262-272.

159. Kuno G., Gubler D.J., Santiago de Weil N.S. Antigen capture ELISA for the identification of dengue viruses // *Journal of virological methods*. – 1985. – V. 12(1-2). – P. 93-103.
160. Kunze U. The International Scientific Working Group on Tick-Borne Encephalitis (ISW TBE): review of 17 years of activity and commitment // *Ticks and tick-borne diseases*. – 2016 – V. 7(3). – P. 399-404.
161. Labuda M., Austin J.A., Zuffova E., Kozuch O., Fuchsberger N., Lysy J., Nuttals P.A. Importance of localized skin infection in TBEV transmission // *Virology*. 1996. – V. 219. – P. 357-366.
162. Labuda M., Jiang W.R., Kaluzova M., Kozuch O., Nuttal P.A., Weismann P., Eleckova E., Zuffova E., Gould E. A. Change in phenotype of tick-borne encephalitis virus following passage in *Ixodes ricinus* ticks and associated amino acid substitution in the envelope protein. *Virus research*. – 1994. – V. 31(3). – P. 305-315.
163. Lalic J., Cuevas J.M., Elena S.F. Effect of Host Species on the Distribution of Mutational Fitness Effects for an RNA Virus // *PLoS Genetics*. – 2011. – V. 7. – e1002378.
164. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I. G., Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East // *Virology*. – 2013. – Vol. 443 (1). – P. 89-98.
165. Levy S.F., Blundell J.R., Venkataram S., Petrov D.A., Fisher D.S., Sherlock G. Quantitative evolutionary dynamics using high-resolution lineage tracking // *Nature* – 2015. – V. 519 – P. 1–9.
166. Lin Y.L., Chen L.K., Liao C.L., Yeh C.T., Ma S. H., Chen J. L., Huang Y. L., Chen S. S., and Chiang H. Y. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice // *Journal of Virology*. – 1998. – V. 72(1). – P. 191-200.

167. Lindenbach B.D. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication* / Edited by Knipe P.M., Howley P.M. – Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007. – P. 1101-1151.
168. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C.E., Epstein J.H., Wang H., Crameri G.S., Hu Z., Zhang H., Zhang J., McEachern J. A., Field H. E., Daszak P., Eaton B.T., Zhang S., Wang L.-F. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses // *Science*. – 2005. – V. 310. – P. 676-679
169. Liu W.M., Li Y.Y., Learn G.H., Rudicell R.S., Robertson J.D., Keele B., Ndjanga J.-B. N., Sanz C., Morgan D., Locatelli S., Gonder M. K., Kranzusch P. J., Walsh P., Delaporte E., Mpoudi-Ngole E., Georgiev A., Muller M., Shaw G., Peeters M., Sharp P., Rayner J., Hahn B. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas // *Nature*. – 2010. – V. 467. – P. 420-467.
170. Liu Z.-Y., Li X.-F., Jiang T., Deng Y.-Q., Ye Q., Zhao H., Yu J.-Y., Qin C.-F. Viral RNA switch mediates the dynamic control of flavivirus replicase recruitment by genome cyclization. – 2016. – *eLife*. 5. – e17636. <https://doi.org/10.7554/eLife.17636>
171. Loktev V.B. Tick-borne encephalitis virus. Genetic features, variability in modern world // *Bulletin SD RAMS*. – 2007. – V. 4(126). – P. 14-21.
172. Loverdo C., Lloyd-Smith J.O. Evolutionary Invasion and Escape in the Presence of Deleterious Mutations // *Plos ONE*. – 2013. – V. 8. – e61879.
173. Mackenzie J.M., Khromykh A.A., Jones M.K., Westaway E.G. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A // *Virology*. – 1998. – V. 245(2). – P. 203-215.
174. Mandl C.W., Aberle J.H., Aberle S.W., Holzmann H., Allison S.L., Heinz F.X. In vitro-synthesized infectious RNA as an attenuated live vaccine in a flavivirus model // *Nat Med*. – 1998. – V. 4(12). – P. 1438-1440.

175. Mandl C.W., Allison S.L., Holzmann H., Meixner T., Heinz F.X. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative Flavivirus receptor binding site // *Journal of Virology*. – 2000. – V. 74. – P. 9601-9609.
176. Mandl C.W., Ecker M., Holzmann H., Kunz Ch., Heinz F. X. Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr // *Journal of general virology*. – 1997. – 78(5). – P. 1049-1057.
177. 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. – V. 194. – P. 173-184.
178. Mandl C.W., Holzmann H., Meixner T., Rauscher S., Stadler P.F., Allison S.L., Heinz F.X. Spontaneous and Engineered Deletions in the 3' Noncoding Region of Tick-Borne Encephalitis Virus: Construction of Highly Attenuated Mutants of a Flavivirus // *Journal of Virology*. – 1998. – V. 72. – P. 2132-2140.
179. Mandl C.W., Kroschewski H., Allison S.L., Kofler R., Holzmann H., Meixner T., Heinz F.X. Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo // *Journal of Virology*. – 2001. – V. 75(12). – P. 5627-5637.
180. Mann M.E., Zhang Z., Rutherford S., Bradley R.S., Hughes M.K., Shindell D., Ammann C., Faluvegi G., Ni F. Global signatures and dynamical origins of the little ice age and medieval climate anomaly // *Science*. – 2009. – V. 326. – P. 1256-1260.
181. Manokaran G., Finol E., Wang C., Gunaratne J., Bahl J., Ong E.Z., Tan H.C., Sessions O.M., Ward A.M., Gubler D.J., Harris E., Garcia-Blanco M.A., Ooi E.E. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit

- interferon expression for epidemiological fitness // *Science*. – 2015. – V. 350. – P. 217-221.
182. Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephenson J.R., Fooks A.R., Solomon T. Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis // *Journal of General Virology*. – 2009. – V. 90(8). – P. 1781-1794.
183. Manzano M., Reichert E.D., Polo S., Falgout B., Kasprzak W., Shapiro B.A., Padmanabhan R. Identification of cis-acting elements in the 3'-untranslated region of the dengue virus type 2 RNA that modulate translation and replication // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – V. 286. – P. 22521-22534.
184. Marin M.S. Phylogeny of TYU, SRE, and CFA virus: different evolutionary rates in the genus *Flavivirus* // *Virology*. – 1995. – V. 206(2). – P. 1133-1139.
185. Markham N.R., Zuker M. UNAFold. In: Keith J.M. (eds) *Bioinformatics. Methods in Molecular Biology*. – Humana Press., 2008. – V. 453. – P. 3 – 31. doi.org/10.1007/978-1-60327-429-6\_1.
186. Markoff L. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA // *Advances in Virus Research*. – 2003. – V. 59. – P. 177-228.
187. Markoff L., Falgout B., Chang A. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein // *Virology*. – 1997. – V. 233. – P. 105-117.
188. Markoff L., Pang X., Houg Hs H.S., Falgout B., Olsen R., Jones E., Polo S. Derivation and characterization of a dengue type 1 host range-restricted mutant virus that is attenuated and highly immunogenic in monkeys // *J Virol*. – 2002. – V.76. – 3318-3328.
189. McMinn P.C. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses // *Journal of General Virology*. – 1997. – V. 78(11). – P. 2711-2722.

190. Mir D., Delatorre E., Bonaldo M., Lourenco-de-Oliveira R., Vicente A.C, Bello G. Phylodynamics of yellow fever virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – P. 7385.
191. Monath T.P., Heinz F.X. Flaviviruses / In: *Fields Virology*. Edited by Fields B.N., Knipe D. M., Howley P.M. – Lippincott-Raven, Philadelphia & New-York., 1995. – V.1. – P. 961-1034.
192. Moon S.L., Dodd B.J., Brackney D.E., Wilusz C.J, Ebel G.D., Wilusz J. Flavivirus sfRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery // *Virology*. – 2015. – V. 485. – P. 322-329.
193. Mukhopadhyay S., Kuhn R. J., Rossmann M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle // *Nature Reviews Microbiology*. – 2005. – V. 3(1). – P. 13-22.
194. Muller D.A., Young P.R.. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker // *Antiviral research*. – 2013. – V. 98(2). – P. 192-208.
195. Ng M.L., Hong S.S. Flavivirus infection: essential ultrastructural changes and association of Kunjin virus NS3 protein with microtubules // *Archives of Virology*. – 1989. – V. 106. – P. 103-120.
196. Nosek J., Kořuch O., Grulich I. The structure of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Central Europe // *Oecologia*. – 1970. –V. 5(1). – P. 61-73.
197. Nowak T., Färber P. M., Wengler G., Wengler G. Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis // *Virology*. – 1989. – V. 169(2). – P. 365-376

198. Nowak T., Wengler G. Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus // *Virology*. – 1987. – V. 156(1). – P. 127-137.
199. Ochsenreiter R., Hofacker I.L., Wolfinger M.T. Functional RNA Structures in the 3'UTR of Tick-Borne, Insect-Specific and No-Known-Vector Flaviviruses // *Viruses* – 2019. – V. 11. – P. 298.
200. Ogden N.H., Maarouf A., Barker I.K., Bigras Poulin M., Lindsay L.R., Morshed M.G., O'Callaghan C.J., Ramay F., Waltner Toews D., Charron D.F. Climate change and the potential for range expansion of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in Canada // *International journal for parasitology*. – 2006. – V. 36(1). – P. 63-70.
201. Olsthoorn R.C., Bol J.F. Sequence comparison and secondary structure analysis of the 3' noncoding region of flavivirus genomes reveals multiple pseudoknots // *RNA*. – 2001. – V. 7. – P. 1370-1377.
202. Pijlman G.P., Funk A., Kondratieva N., Leung J., Torres S., van der Aa L., Liu W.J., Palmenberg A.C., Shi P.Y., Hall R.A., Khromykh A.A. A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity // *Cell Host Microbe*. – 2008. – V. 4(6). – P. 579 - 591.
203. Pletnev A.G. Infectious cDNA clone of attenuated Langat tick-borne flavivirus (strain E5) and a 3' deletion mutant constructed from it exhibit decreased neuroinvasiveness in immunodeficient mice // *Virology*. – 2001. – V. 282(2). – P. 288-300.
204. Ponomareva E.P., Mikryukova T.P., Kartashov M.Y., Protopopova E.V., Chausov E.V., Konovalova S.N., Tupota N.L., Ternovoi V.A., Loktev V.B., Gori A.V., Gheorghita S.D., Burlacu V.I. Detection of Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis viral RNA in ticks collected in the Republic of Moldova // *Journal of Vector Borne Diseases*. – 2015. – T. 52(4). C. 334-336.

205. Ponomareva E.P., Ternovoi V.A., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Gladysheva A.V., Shvalov A.N., Konovalova S.N., Chausov E.V., Loktev V.B. Adaptation of tick-borne encephalitis virus from human brain to different cell cultures induces multiple genomic substitutions // *Archives of Virology*. – 2017. – V. 162(10). – P. 3151-3156.
206. Protopopova E.V., Sorokin A. V., Konovalova S.N., Kachko A., Netesov S.V., Loktev V.B. Human laminin-binding protein as cell receptor for the tick-borne encephalitis virus // *Zentralblatt Fur Bakteriologie-international Journal of Medical Microbiology Virology Parasitology and Infectious Diseases*. – 1999. – V. 289. – P. 632-638.
207. Proutski V., Gritsun T.S., Gould E.A., Holmes E.C. Biological consequences of deletions within the 3'-untranslated region of flaviviruses may be due to rearrangements of RNA secondary structure // *Virus Res*. – 1999. – V. 64(2). – P. 107-123.
208. Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Vysochina N.P., Belozerova N.B., Bakhmetyeva S.V., N.I., Seligman S.J., Ivanov L.I. Tick-borne encephalitis virus in arthropod vectors in the Far East of Russia // *Ticks and tick-borne diseases*. – 2018. – V. 9(4). – P. 824-833.
209. Randolph S.E. To what extent has climate change contributed to the recent epidemiology of tick-borne diseases? // *Veterinary Parasitology*. – 2010. – V. 167(2-4). – P. 92-94.
210. Rar V., Livanova N., Tkachev S., Kaverina G., Tikunov A., Sabitova Yul., Igolkina Y., Panov V., Livanov S., Fomenko N., Babkin I., Tikunova N. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia // *Parasit Vectors*. – 2017. – V. 10(1). – P. 258.
211. Rar V. A, Livanova N. N., Sabitova Yul., Igolkina Yana, Tkachev S. E., Tikunov A. Yu., Babkin I. V., Golovljova I., Panov V. V., Tikunova N. V. *Ixodes persulcatus* / *pavlovskyi* natural hybrids in Siberia: Occurrence in

- sympatric areas and infection by a wide range of tick-transmitted agents // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2019. – V. 10(6). – 101254.
212. Remold S.K., Rambaut A., Turner P.E. Evolutionary genomics of host adaptation in vesicular stomatitis virus // *Molecular biology and evolution.* – 2008. – V. 25(6). – P. 1138-1147.
213. Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunz C., Harrison S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution // *Nature.* – 1995. – V. 375. – P. 291-298.
214. Rice C. Flaviviridae: the viruses and their replication / In: *Fields Virology.* Edited by Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. – Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia and New York, 1996. – P. 931-959.
215. Roehrig J. T. Antigenic structure of flavivirus proteins // *Advances in virus research.* – 2003. – V. 59. – P. 141-175.
216. Romanova L.Iu., Gmyl A.P., Dzhivanian T.I., Bakhmutov D.V., Lukashev A.N., Gmyl L.V., Rummyantsev A.A., Burenkova L.A., Lashkevich V.A., Karganova G.G. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation // *Virology.* – 2007. – T. 362(1). – C. 75-84.
217. Ruiz-Jarabo C.M., Arias A., Baranowski E., Escarmis C., Domingo E. Memory in viral quasispecies // *Journal of Virology.* – 2000. – V. 74(8) – P. 3543-3547.
218. Ruiz-Jarabo C.M., Arias A., Molina-Paris C., Briones C., Baranowski E., Escarmis C., Domingo E. Duration and fitness dependence of quasispecies memory // *Journal Of Molecular Biology.* – 2002. – V. 315(3) – P. 285-296.
219. Russell P.K., Brandt W.E., Dalrymple J.M. Chemical and antigenic structure of flaviviruses / In: *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication.* Edited by Schlesinger R.W. – Academic Press., New York, 1980. – P. 503-529.
220. Ruzek D., Gritsun T.S., Forrester N.L., Gould E.A., Kopecký J., Golovchenko M., Rudenko N., Grubhoffer L. Mutations in the NS2B and

- NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus // *Virology*. – 2008. – V. 374(2). – P. 249-255.
221. Rzhetsky A., Nei M. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees // *Molecular Biology and Evolution*. – 1992. – V. 9. – P. 945-967.
222. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. – 1987. – V. 4(4). – P. 406-425.
223. Sakai M., Muto M., Hirano M., Kariwa H., Yoshii K. Virulence of tick-borne encephalitis virus is associated with intact conformational viral RNA structures in the variable region of the 3'-UTR // *Virus Res.* – 2015. – V. 203. – P. 36-40.
224. Sanjuan R., Nebot M.R., Chirico N., Mansky L.M., Belshaw R. Viral mutation rates // *Journal of Virology*. – 2010. – V. 84. – P. 9733-9748.
225. Schmidt H. A., Strimmer K., Vingron M., von Haeseler A. TREEPUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing // *Bioinformatics*. – 2002. – V. 18(3). P. 502-504.
226. Shan C., Muruato A.E., Nunes B.T.D., Luo H., Xie X., Medeiros D.B.A., Wakamiya M., Tesh R.B., Barrett A.D., Wang T., Weaver S.C., Vasconcelos P.F.C., Rossi S.L., Shi P.Y. A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models // *Nature Communications*. – 2017. – V. 23. – P. 763-767.
227. Sharp P.M., Hahn B.H. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – V. 365. – 2010. – P. 2487-2494.
228. Shevtsova A.S., Motuzova O. V., Kuragina V.M., Akhmatova N.K., Gmyl L.V., Kondrat'eva Y.I., Kozlovskaya L.I., Rogova Y. V., Litov A.G., Romanova L.I., Karganova G.G. Lethal experimental tick-borne encephalitis

- infection: influence of two strains with similar virulence on the immune response // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 7. – P.1-13.
229. Shinya K., Ebina M., Yamada S., Ono M., Kasai N., Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway // *Nature*. – 2006. – V. 440. – P. 435-436.
230. Shurtleff A.C., Beasley D.W., Chen J.J., Ni H., Suderman M.T., Wang H., Xu R., Wang E., Weaver S.C., Watts D.M., Russell K.L., Barrett A.D. 2001. Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses // *Virology*. – 2001. – V. 281. – P. 75-87.
231. Simmonds P., Becher P., Collett M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Meyers G., Monath T., Pletnev A., Rice C.M., Stiasny K., Thiel H.-J., Weiner A., Bukh J. Family Flaviviridae / In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Edited by King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. – Elsevier Academic Press. – San Diego. – CA: Elsevier Academic Press. – 2012. – P. 1003-1020.
232. Simmonds P., Becher B., Bukh J., Gould E.A., Meyers, G., Monath T., Muerhoff S., Pletnev A., Rico-Hesse R., Smith D.B., Stapleton J.T. ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: flaviviridae // *Journal of General Virology*. – 2017. – V. 98(1). – P. 2-3.
233. Stadler K., Allison S.L., Schalich J, et al. Proteolytic activation of tickborne encephalitis virus by furin // *Journal of virology*. – 1997. – V. 71. – P. 8475-8481.
234. Strode G.K., ed. *Yellow Fever*. – New York: McGraw-Hill, 1951. – 720 p.
235. Sztuba-Solinska J, Teramoto T, Rausch JW, Shapiro BA, Padmanabhan R, Le Grice SF. 2013. Structural complexity of Dengue virus untranslated regions: cis-acting RNA motifs and pseudoknot interactions modulating functionality of the viral genome // *Nucleic Acids Research*. – V. 4. – P. 5075-5089.

236. Takashima I., Morita K., Chiba M., Hayasaka D., Sato T., Takezawa C., Igarashi A., Kariwa H., Yoshimatsu K., Arikawa J., Hashimoto N. A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1997. – V. 35. – P. 1943-1947.
237. Takashima I., Hayasaka D., Goto A., Kariwa H., Mizutani T. Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) and phylogenetic analysis of TBE viruses in Japan and Far Eastern Russia // *Japanese journal of infectious diseases*. – 2001. – V. 54(1). – P. 1-11.
238. Takeda T., Ito T., Osada M., Takahashi K., Takashima I. Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and a seroepizootiologic survey in Hokkaido, Japan // *American journal of tropical medicine and hygiene*. – 1999. – V. 60(2). – P. 287-291.
239. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Molecular Biology and Evolution*. – 1993. – V. 10(3). – P. 512-526.
240. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Molecular biology and evolution*. – 2011. – V. 28(10). – P. 2731-2739.
241. Ternovoi V.A., Gladysheva A.V., Ponomareva E.P., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Shvalov A.N., Konovalova S.N., Chausov E.V., Loktev V.B. Variability in the 3' untranslated regions of the genomes of the different tick-borne encephalitis virus subtypes // *Virus Genes*. – 2019. – V. 55(4). – P. 448-457.
242. Ternovoi V.A., Kurzhuikov G.P., Sokolov Y.V., Ivanov G.Y., Ivanisenko V.A., Loktev A.V., Ryder R. W., Netesov S.V., Loktev V.B. Tick-Borne Encephalitis with Hemorrhagic Syndrome, Novosibirsk Region, Russia, 1999 // *Emerging Infectious Diseases*. – 2003. – V. 9. – P. 743-746.

243. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Chausov E.V., Novikov D.V., Leonova G.N., Netesov S.V., Loktev V.B. Novel variant of tickborne encephalitis virus, Russia // *Emerging Infectious Diseases*. – 2007. – V. 13. – P. 1574-1578.
244. The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China // *Zhonghua liuxingbingxue zazhi*. – 2020. – V. 41(2). – P. 145-151.
245. Thiel H.-J., Collett M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Houghton M., Meyers G., Purcell R.H., Rice C.M. Family flaviviridae / In: *Virus Taxonomy*. Edited by Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses . – San Diego: Academic Press, 2005. – P. 979-996.
246. Thurner C., Witwer C., Hofacker I.L., Stadler P.F. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. // *Journal of general virology*. – 2004. – V. 85(5). – P. 1113-1124.
247. Tilgner M., Shi P.Y., Lo M.K., Bernard K.A. Structure and function of the 3' terminal six nucleotides of the west nile virus genome in viral replication // *Journal of Virology*. – 2004. – V. 78. – P. 8159-8171.
248. Tsetsarkin K.A., Chen R.B., Leal G., Forrester N., Higgs S., Huang J., Weaver S. Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – V. 108. – P. 7872-7877.
249. Tuplin A., Evans D. J, Buckley A., Jones I.M., Gould E. A., Gritsun T. S. Replication enhancer elements within the open reading frame of tick-borne encephalitis virus and their evolution within the Flavivirus genus // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – V. 39(16). – P. 7034-7048.

250. Villordo S.M., Alvarez D.E., Gamarnik A.V. A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication // RNA. – 2010. – V. 16. – P. 2325-2335.
251. Villordo S.M., Carballeda J.M., Filomatori C.V., Gamarnik A.V. RNA structure duplications and flavivirus host adaptation // Trends in microbiology. – 2016. – V. 24. – P. 270-283.
252. Villordo S.M., Filomatori C.V., Sanchez-Vargas I., Blair C.D., Gamarnik A.V. Dengue virus RNA structure specialization facilitates host adaptation // PLoS Pathogens. – 2015. – V. 11. – e1004604.
253. Ward A.M., Bidet K., Yinglin A., Ler S.G., Hogue K., Blackstock W., Gunaratne J., Garcia-Blanco M.A. Quantitative mass spectrometry of DENV-2 RNA-interacting proteins reveals that the DEAD-box RNA helicase DDX6 binds the DB1 and DB2 3' UTR structures // RNA Biology. – 2011. – V. 8. – P. 1173-1186.
254. Waxman D., Weinert L.A., Welch J.J. Inferring host range dynamics from comparative data: the protozoan parasites of new world monkeys // The American Naturalist. – 2014. – V. 184. – P. 65-74.
255. Webby R.J., Webster R.G. Emergence of influenza A viruses // Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2001. – V. 356. – P. 1817-1828.
256. Westaway E.G., Khromykh A.A., Kenney M.T., Mackenzie J. M., Jones M. K. Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus // Virology. – 1997. – V. 234(1). – P. 31-41.
257. Wichman H.A., Badgett M.R., Scott L.A., Boulianne C.M., Bull J.J. Different trajectories of parallel evolution during viral adaptation // Science. – 1999. – V. 285(5426). – P. 422-424.
258. Woolhouse M.E., Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens // Emerging Infectious Diseases. – 2005. – V. 11. – P. 1842-1847.

259. Woolhouse M.E., Haydon D.T., Antia R. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps // *Trends in Ecology and Evolution*. – 2005. – V. 20. – P. 238-244.
260. [www.expasy.ch/viralzone](http://www.expasy.ch/viralzone) Швейцарский институт биоинформатики.
261. Yamshchikov V.F., Compans R.W. Regulation of the late events in flavivirus protein processing and maturation // *Virology*. – 1993. – V. 192(1). – P. 38-51.
262. Yoshii K., Konno A., Goto A., Nio J., Obara M., Ueki T., Hayasaka D., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I.J. Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion // *Gen Virol*. – 2004. – V. 85(10). – P. 3049-3058.
263. Zanotto P.M.A., Gould E. A., Gao G. F., Harvey P.H., Holmes E.C. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – V. 93(2). – P. 548-553.
264. Zanotto P.M.A., Gao G.F., Gritsun T., Marin M.S., Jiang W.R., Venugopal K., Reid H.W., Gould E.A. An arbovirus cline across the northern hemisphere // *Virology*. – 1995. – V. 210(1). – P. 152-159.
265. Zlobin V.I., Verkhozina M.M., Demina T.V., Dzhioev Yu. P., Adel'shin R. V., Kozlova I. V., Belikov S. I., Khasnatinov M. A., Danchinova G.A., Isaeva E. I., Grischekin A.E. Molecular epidemiology of Tick-borne encephalitis // *Voprosy virusologii*. – 2007. – V. 52(6). – P. 4-13.







