

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРОБЛЕМ
ЗДОРОВЬЯ СЕМЬИ И РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА»
(ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ)

На правах рукописи

Ляпунова Наталья Андреевна

ОСОБЕННОСТИ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
В ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЯХ КЛЕТОК ДИКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ –
РЕЗЕРВУАРНЫХ И СЛУЧАЙНЫХ ХОЗЯЕВ ВИРУСА

03.02.02 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Хаснатинов М.А.

Научный консультант:
доктор биологических наук,
Данчинова Г.А.

Иркутск – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1 Эпидемиологическая значимость вируса клещевого энцефалита	17
1.2 Биологическая характеристика вируса клещевого энцефалита ...	19
1.3 Циркуляция вируса клещевого энцефалита в природе	25
1.3.1 Основные беспозвоночные хозяева вируса клещевого энцефалита	25
1.3.2 Основные позвоночные хозяева вируса клещевого энцефалита	29
1.4 Современные подходы к изучению биологии вируса клещевого энцефалита	34
1.4.1 Анализ генома вируса клещевого энцефалита	34
1.4.2 Современные подходы к моделированию инфекции вируса клещевого энцефалита	37
1.4.2.1 <i>In vivo</i> модели вируса клещевого энцефалита	38
1.4.2.2 <i>In vitro</i> модели вируса клещевого энцефалита	41
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
2.1 Материалы	49
2.1.1 Вирус	49
2.1.2 Культуры клеток млекопитающих	49
2.2 Методы	50

2.2.1 Культивирование клеток млекопитающих	50
2.2.2 Подтверждение видовой идентичности культур клеток млекопитающих	51
2.2.3 Оценка динамики репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток млекопитающих	53
2.2.4 Титрование вируса клещевого энцефалита по бляшкообразующим единицам и морфология бляшек	54
2.2.5 Оценка цитопатического действия вируса клещевого энцефалита	54
2.2.6 Выделение РНК, реакция обратной транскрипции, полимеразная цепная реакция	55
2.2.7 Секвенирование	56
2.2.8 Приготовление стандартных образцов концентрации РНК для количественной полимеразной цепной реакции	60
2.2.9 Определение антигена вируса клещевого энцефалита	62
2.2.10 Представление результатов корреляционного анализа стадий репродукции вируса клещевого энцефалита в разных клеточных линиях	63
2.2.11 Статистическая обработка данных	64

ГЛАВА 3 ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА СПОСОБЕН РЕПРОДУЦИРОВАТЬСЯ В ЛИНИЯХ КЛЕТОК РЕЗЕРВУАРНОГО И СЛУЧАЙНОГО ХОЗЯЕВ ПРИ ВЫСОКОЙ МНОЖЕСТВЕННОСТИ ЗАРАЖЕНИЯ	65
3.1 Формирование стоков культур клеток и верификация видовой принадлежности	65

3.2	Оценка цитопатического действия вируса клещевого энцефалита в клеточных линиях СПЭВ, ArnK и MdbK	67
3.3	Сравнение динамики репликации вирусной РНК в исследуемых клеточных линиях при высокой множественности инфекции	69
3.4	Оценка динамики синтеза вирусного антигена в исследуемых клеточных линиях при высокой множественности инфекции	71
3.5	Динамика репродукции инфекционного вируса в исследуемых клеточных линиях при высокой множественности инфекции	72
ГЛАВА 4 ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА СПОСОБЕН К ПЕРСИСТЕНТНОЙ ИНФЕКЦИИ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ РЕЗЕРВУАРНОГО И СЛУЧАЙНОГО ХОЗЯЕВ НА ПРОТЯЖЕНИИ 6 МЕСЯЦЕВ		76
4.1	Сравнение динамики репликации вирусной РНК в клеточных линиях СПЭВ, ArnK и MdbK при персистентной инфекции	76
4.2	Оценка динамики синтеза вирусного антигена в исследуемых клеточных линиях при персистентной инфекции	78
4.3	Динамика репродукции инфекционного вируса в исследуемых клеточных линиях при персистентной инфекции	80
4.4	Оценка согласованности стадий репродукции вируса клещевого энцефалита в исследуемых клеточных линиях.	82
ГЛАВА 5 АДАПТАЦИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА К РАЗНЫМ КУЛЬТУРАМ КЛЕТОК АССОЦИИРОВАНА СО СПЕЦИФИЧНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ В ВИРУСНОМ ГЕНОМЕ		88
5.1	Изменения в геноме вируса клещевого энцефалита	88
5.2	Изменения в структуре белков вируса клещевого энцефалита . . .	89

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
ВЫВОДЫ	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Клещевой энцефалит (КЭ) остаётся одной из наиболее опасных и широко распространённых природно-очаговых болезней в Российской Федерации. Возбудителем заболевания является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), который относится к семейству *Flaviviridae* и передаётся человеку при укусах иксодовых клещей. В природе резервуарными хозяевами ВКЭ являются дикие млекопитающие мелких и средних размеров. В азиатской части Евразии основными резервуарами ВКЭ и прокормителями таёжных клещей являются красно-серая полёвка (*Myodes rufocanus*), полёвка-экономка (*Microtus oeconomus*), восточноазиатская лесная мышь (*Apodemus peninsulae*) и сибирский бурундук (*Tamias sibiricus*) [20]. Отмечено, что заражённость восточноазиатских мышей, широко распространённых в Восточной Сибири, может превышать 20 % [20, 66]. Случайные хозяева вируса, например, рукокрылые и пресмыкающиеся, также способны поддерживать репродукцию ВКЭ, но в силу своей биологии они редко подвергаются нападению клещей в природе, поэтому не участвуют в циркуляции вируса [238].

Показано, что даже при развитии генерализованной вирусемии многие резервуарные хозяева переносят инфекцию ВКЭ без клинических проявлений [28, 47, 244]. Однако, попадая в организм неадаптированных животных (случайных хозяев), в том числе и человека, вирус иногда вызывает тяжёлое заболевание и в некоторых случаях гибель хозяина. В настоящее время до конца не выяснено, за счёт чего обеспечивается устойчивость резервуарных хозяев к вирусной инфекции. Сравнительные исследования взаимодействия вируса со специфичными и случайными хозяевами могут дать ценную информацию об особенностях и закономерностях репродукции ВКЭ. Для этого необходимо проведение исследований на клеточном и молекулярном уровнях, что требует подходящих лабораторных моделей, прежде всего перевиваемых клеточных

линий, которые являются одним из наиболее эффективных инструментов современной вирусологии.

Степень разработанности избранной темы

В настоящее время патогенез КЭ в человеческом организме и внутриклеточные механизмы репликации ВКЭ изучены довольно глубоко на лабораторных животных и в культурах клеток, моделирующих заболевание человека. Было показано, что во многом патогенное действие ВКЭ обусловлено развитием воспалительной реакции, угнетением систем врождённого иммунитета заражённой клетки и активацией каскада апоптоза [32, 95, 160].

Однако об особенностях взаимодействия и адаптации вируса и его резервуарных хозяев известно гораздо меньше, и ещё меньше – о взаимодействии вируса и его случайных хозяев. Установлено, что при инфекции мышевидных грызунов – резервуарных хозяев ВКЭ – индуцируется экспрессия генов цитокинов Th2 и Th1 путей, причём для полевых мышей *Apodemus agrarius* была характерна активация интерлейкина-1 β [61]. При заражении культуры клеток рыжей полёвки (*Myodes glareolus*) – основного резервуара ВКЭ в Северной Европе – было выявлено, что ВКЭ индуцирует экспрессию противовирусных элементов врождённого иммунного ответа – интерферона- β и эффекторного белка Mx2 [75]. По экспериментальной инфекции случайных хозяев (летучие мыши, ящерицы) представлены работы в крайне ограниченном количестве [146, 149, 193, 199]. Следует отметить, что к настоящему моменту также не было проведено систематических сравнительных исследований репродукции ВКЭ в клеточных системах его резервуарных и случайных хозяев. Тем не менее, в указанных работах продемонстрирована способность животных, имеющих низкую вероятность контакта с ВКЭ в природе, к поддержанию репродукции клещевых флавивирусов *in vivo* и *in vitro*. Это делает случайных хозяев полезными моделями для проведения исследований по изучению способности вируса репродуцироваться в хозяевах, эволюционно далёких друг от друга, выявлению

скрытых закономерностей циркуляции флавивирусов в природе и изучению адаптации переносимых клещами флавивирусов к различным хозяевам.

В последние годы в качестве наиболее перспективного инструмента в исследованиях зоонозных вирусных инфекций рассматривается создание новых модельных систем на основе культур клеток резервуарных хозяев инфекций [75, 113, 124, 141, 236]. Однако разнообразие, доступность и степень изученности таких моделей ещё очень невелики. Созданная в Швеции (2011) клеточная линия эмбриональных фибробластов *M. glareolus* (VEFs) продемонстрировала восприимчивость к вирусу [75], однако рыжие полёвки не являются резервуарными хозяевами для дальневосточного и сибирского субтипов ВКЭ, распространённых на большей части Российской Федерации. Вторая культура клеток получена в Японии от красно-серой полёвки (*Myodes rufocanus*) – резервуарного хозяина ВКЭ. Но, к сожалению, данная культура не была изучена в отношении её способности поддерживать репликацию ВКЭ и позиционирована как специфичная линия клеток для изоляции полёвочьих хантавирусов [166]. Недавно в лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (НЦ ПЗСРЧ) (г. Иркутск) был разработан ряд культур клеток наземных млекопитающих – хозяев трансмиссивных природно-очаговых инфекций. Прежде всего, это перевиваемая культура клеток почки восточноазиатской лесной мыши *A. peninsulae*, являющейся одним из основных прокормителей иксодовых клещей и резервуарным хозяином для возбудителей многих трансмиссивных инфекций, в том числе и для ВКЭ. Кроме того, была создана перевиваемая линия клеток почки сибирской ночницы *Myotis sibiricus* (Kastschenko, 1905). Это животное в силу своего образа жизни в природе играет роль лишь случайного хозяина ВКЭ. Мы предположили, что эти новые культуры клеток могут служить моделями для изучения особенностей адаптации флавивирусов к внутриклеточной среде позвоночных хозяев вируса.

Целью данной работы было выявление особенностей и сравнение динамики основных стадий репродукции ВКЭ в клетках млекопитающих –

резервуарных и случайных хозяев (на моделях восточноазиатской лесной мыши и сибирской ночницы). Для достижения этой цели было необходимо решить следующие **задачи**:

1. Сформировать и охарактеризовать рабочие стоки клеточных линий резервуарных (*A. peninsulae*) и случайных (*M. sibiricus*) хозяев вируса, верифицировать их видовую принадлежность на основе анализа фрагментов генома.

2. Оценить цитопатическое действие ВКЭ на культуры клеток резервуарных и случайных хозяев.

3. Сравнить динамику репликации внутриклеточной +РНК ВКЭ, синтеза вирусного полипротеина и репродукции инфекционного вируса в культурах клеток резервуарных и случайных хозяев вируса в ходе острой инфекции.

4. Провести сравнительное исследование репродукции инфекционного ВКЭ, репликации внутриклеточной +РНК и синтеза вирусного полипротеина в культурах клеток резервуарных и случайных хозяев вируса в ходе персистентной инфекции.

5. Охарактеризовать процесс адаптации ВКЭ к изучаемым линиям клеток млекопитающих на основе анализа генетических изменений, возникших во время персистентной инфекции.

Научная новизна

В результате выполнения данной работы на примере ВКЭ проведено сравнительное исследование репродукции клещевых флавивирусов в перевиваемых клеточных линиях восточноазиатской лесной мыши (ApnK) и сибирской ночницы (MdbK). Показано, что изучаемые клеточные линии могут быть использованы как стабильные *in vitro* модели репродукции ВКЭ в клетках млекопитающих – резервуарного и случайного хозяев вируса. Также впервые получены сравнительные данные о персистентной инфекции ВКЭ в перевиваемых клеточных линиях разных видов и экологических групп млекопитающих. Кроме этого, на примере культуры клеток почки эмбриона

свиньи СПЭВ описано, что сильное цитопатическое действие вируса либо уничтожает популяцию клеток-хозяев, либо приводит к освобождению клеточной линии от вирусной инфекции. Также в работе была описана устойчивая циркуляция неинфекционной вирусной +РНК в клетках млекопитающих, не вырабатывающих инфекционный ВКЭ.

На примере перевиваемой линии клеток *A. peninsulae* установлено, что в процессе персистентной инфекции в клетках млекопитающих – резервуарных хозяев в геноме ВКЭ появляются аминокислотные замены в белках E (D67N, E122Q, T175I, D203Y и T279K), NS1 (A157V), NS3 (V559L), NS4A (E33G), NS4B (T15K и E20K) и NS5 (A445V, L463R и D635A).

На примере перевиваемой линии клеток *M. sibiricus* установлено, что в процессе персистентной инфекции в клетках млекопитающих – случайных хозяев в геноме ВКЭ появляются аминокислотные замены в белках М (H28Y), E (E155V, E155A, G159R, E201R, D203G, G278R и H282R), NS1 (G191S), NS3 (L487I), NS4A (N103I) и NS5 (H651N и L892V).

Впервые получены данные о специфической роли белков NS4A и NS4B в процессах адаптации ВКЭ к клеткам резервуарных и случайных хозяев. Впервые обнаружено, что белки С, NS2A и NS2B остаются неизменными на протяжении по меньшей мере 6 месяцев при адаптации вируса к новым хозяевам.

Теоретическая значимость

В ходе работы созданы и описаны клеточные модели инфекции ВКЭ у мышевидных грызунов и рукокрылых, оценены особенности взаимодействия ВКЭ и разных видов млекопитающих на клеточном уровне, выявлены видоспецифичные изменения в геноме ВКЭ, происходящие в процессе адаптации к разным по своей роли хозяевам вируса. Полученные данные и разработки в дальнейшем можно будет применить при изучении механизмов, влияющих на эффективность репродукции и трансмиссии ВКЭ в природе, и эти элементы клеточной биологии использовать для разработки новых подходов к подавлению вируса.

В работе показано, что ВКЭ способен репродуцироваться в полученных линиях клеток резервуарного и случайного хозяев при высокой множественности заражения. При этом вирусная репродукция эффективнее протекает в клеточной линии резервуарного хозяина как на уровне репликации РНК ВКЭ, так и на уровне продукции инфекционного ВКЭ. Кроме того, линия клеток *A. peninsulae* эффективно накапливает антиген ВКЭ, тогда как клеточная линия *M. sibiricus* продемонстрировала неспособность к его накоплению. Эти данные поднимают вопрос о реальном значении персистенции ВКЭ среди млекопитающих в естественных условиях, о роли этого явления в формировании природных очагов КЭ и о необходимости совершенствования подходов к изучению персистентной инфекции у млекопитающих.

Предложен оригинальный способ сравнительной оценки согласованности репродукции ВКЭ в различных культурах клеток. Способ основан на анализе корреляций между различными стадиями репродукции ВКЭ на разных сроках и при разной множественности инфекции. Способ может быть использован для оценки относительной адаптированности вирусов к внутриклеточной среде различных хозяев.

Практическая значимость

В ходе выполнения работы показана способность клеточной линии резервуарного хозяина *A. peninsulae* эффективно синтезировать антиген ВКЭ в течение длительного времени, что делает её подходящим перспективным субстратом для наработки вирусных антигенов, используемых в производстве вакцин и иммунодиагностикомов. По результатам исследований был разработан и защищён патентом способ получения монослойной перевиваемой линии клеток почки *A. peninsulae* для репродукции ВКЭ и производства вирусного антигена для вакцин и диагностических препаратов (Патент RU 2017117772).

Успешное изучение репродукции ВКЭ позволяет ожидать, что созданные клеточные линии восточноазиатской лесной мыши и сибирской ночницы могут

быть использованы для изоляции, изучения и наработки антигенов других зоонозных вирусных инфекций.

Полученные в результате работы нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу данных GenBank – KT983422.1, KT983423.1, MT984208.1, MT974474 – и могут быть использованы для изучения распространения, генетического разнообразия и популяционной структуры *A. peninsulae*, *M. sibiricus* и ВКЭ.

Методология и методы исследования

В данном исследовании изучалась эффективность репродукции ВКЭ в линиях клеток млекопитающих, играющих разную роль для его выживания в природе. Работа основана на использовании недавно разработанных в лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ перевиваемых культур клеток почки восточноазиатской мыши *A. peninsulae* (ArnK) и сибирской ночницы *M. sibiricus* (MdbK). Изучение особенностей вирусной репродукции в новых клеточных линиях проводили с использованием ранее описанного изолята ВКЭ 92М, относящегося к Сибирскому субтипу [12]. В качестве референсной лабораторной модели выбрана широко используемая в исследованиях флавивирусов культура клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ.

В ходе исследования сначала были сформированы и охарактеризованы стабильные рабочие стоки культур клеток ArnK и MdbK. Далее на основе анализа фрагментов генома CytB (ген цитохрома В), d-loop (ген D-петли) и COI (ген цитохромоксидазы 1) была подтверждена видовая принадлежность культур клеток. Затем было оценено цитопатическое действие ВКЭ на эти культуры клеток, и далее в серии параллельных экспериментов было проведено сравнение эффективности репродукции ВКЭ в клетках ArnK, MdbK и СПЭВ. Для этого были выбраны такие показатели, как динамика репликации вирусной РНК, динамика синтеза вирусного полипротеина и динамика накопления инфекционного вируса при высокой и низкой множественности инфекции (МИ) (соответственно, МИ = 10 и МИ = 0,1 БОЕ на клетку). Также в работе оценивалась

согласованность протекания указанных этапов репродукции ВКЭ в каждой клеточной линии. В заключение был проведён анализ адаптивных генетических и фенотипических изменений в геноме ВКЭ, произошедших в линиях клеток AprnK и MdbK в процессе персистентной инфекции при низкой множественности заражения.

В работе использовались следующие основные методы:

- цитологические (культивирование клеток млекопитающих, изучение морфологии клеток с помощью световой микроскопии окрашенных препаратов);
- молекулярно-генетические (изучение фенотипических проявлений в культурах клеток млекопитающих, обратная транскрипция, количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР), NGS-секвенирование, молекулярное клонирование фрагментов вирусного генома в плазмидных бактериальных векторах, T7-транскрипция);
- вирусологические и микробиологические (прямая микроскопия, оценка вирулентности и эффективности репродукции ВКЭ в клеточных моделях; иммуноферментный анализ);
- статистические (корреляционный анализ *r*-Спирмена, критерий оценки статистической значимости различий Манна – Уитни, *t*-критерий Стьюдента, квартильный метод исключения выпадающих значений).

Положения, выносимые на защиту

1. Культуры клеток AprnK и MdbK являются стабильными перевиваемыми клеточными линиями восточноазиатской лесной мыши и сибирской ночницы и могут быть использованы в качестве *in vitro* моделей клеток резервуарного и случайного хозяина ВКЭ соответственно.
2. Перевиваемая клеточная линия резервуарного хозяина (AprnK) поддерживает репродукцию ВКЭ с высокой эффективностью, тогда как в линии клеток случайного хозяина (MdbK) репродукция ВКЭ существенно угнетена.

3. В клетках млекопитающих возможно выявление неинфекционной внутриклеточной вирусной +РНК, по меньшей мере в течение 17 недель после заражения. При этом ни инфекционный вирус, ни антиген ВКЭ не синтезируются.

4. В процессе адаптации ВКЭ к клеткам *A. peninsulae* и *M. sibiricus* происходят видоспецифичные изменения в генах, кодирующих вирусные белки E, NS4A и NS4B. Белки C, prM, NS2A и NS2B не играют определяющей роли при адаптации ВКЭ к исследуемым культурам клеток млекопитающих.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением экспериментов в строго контролируемых условиях. Каждый эксперимент был проведён по меньшей мере в трёх биологических воспроизведениях. На каждом этапе присутствовали отрицательные и положительные контрольные образцы. В экспериментах по изучению эффективности репродукции ВКЭ в клеточных линиях млекопитающих в качестве референс-культуры использована хорошо охарактеризованная лабораторная модель – клеточная линия почки эмбриона свиньи СПЭВ, полученная из государственной коллекции клеточных линий. Для изучения персистентной инфекции в каждой культуре клеток были созданы 4 независимых эволюционных линии ВКЭ, при этом характеристики каждой эволюционной линии устанавливались в трёх независимых воспроизведениях. Статистическая обработка полученных данных была проведена с учётом критериев статистической значимости. Достоверность данных, полученных с помощью высокопродуктивного секвенирования, обеспечивается определением нуклеотидной последовательности генома каждого образца в двух независимых технических повторах, для того чтобы идентифицировать мутации, внесённые ошибками полимераз во время подготовки образцов к секвенированию.

По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 5 – в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, из которых 2 – в журналах, индексируемых в БД Web of Science.

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на российских и зарубежных научных конференциях, в том числе на: научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезней человека», посвящённой 95-летию основания Омского НИИ природно-очаговых инфекций (Омск, 2016); IX Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Иркутск, 2017); Международной научно-практической конференции, посвящённой 20-летию научного сотрудничества между Россией и Монголией «Разные страны – общие проблемы природно-очаговых инфекций» (Иркутск, 2018); III Байкальской международной научной конференции «Природно-очаговые трансмиссивные инфекции» (Иркутск, 2018); International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance «IMED 2018» (Вена, Австрия, 2018); Международной конференции «Перспективы развития биомедицинских технологий в Байкальском регионе» (Иркутск, 2019); Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Иркутск, 2019); IV Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (Иркутск, 2020).

Личный вклад автора

Основные результаты работы были получены лично автором или при его непосредственном участии. Вклад автора заключается в планировании исследования, проведении экспериментов, обработке, анализе и оформлении полученных данных, публикации результатов исследований и представлении их на конференциях.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка использованной литературы; изложена на 134 страницах текста, иллюстрирована 8 рисунками и 10 таблицами. Список использованной литературы включает в себя 272 наименования, из них 71 – на русском языке, 201 – на иностранных языках.

Благодарности

Автор признателен директору ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ член-корреспонденту РАН, д.м.н., профессору Л. В. Рычковой за предоставление возможности проведения исследований, а также коллективу лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ за практическую помощь и поддержку в проведении исследований. Автор выражает свою благодарность д.м.н., профессору А. Д. Ботвинкину (ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России) и д.м.н. Е.И. Андаеву (ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора) за детальный анализ рукописи и ценные замечания.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпидемиологическая значимость вируса клещевого энцефалита

Клещевой энцефалит – острое инфекционное вирусное заболевание, характеризующееся лихорадкой, интоксикацией и поражающее центральную нервную систему. Возбудителем клещевого вирусного энцефалита (КВЭ) является вирус клещевого энцефалита. Значимость клещевого вирусного энцефалита определяется возможным смертельным исходом, инвалидностью, переходом заболевания в хроническую форму [49, 98, 202], а также высокой стоимостью лечения.

Первое описание болезни, ассоциируемой с КЭ, было обнаружено в скандинавских церковных записях XVIII века [181]. Болезнь была описана как клинический феномен в 1931 году в Австрии [223], а её возбудитель был выделен в 1937 году советскими учёными на Дальнем Востоке из крови и ликвора больных, от иксодовых клещей и некоторых диких животных [17, 70]. На сегодняшний день установлено, что ВКЭ эндемичен как для Дальнего Востока, так и для Северной, Центральной и Восточной Европы и России [112]. В Европе эндемичными являются 27 стран, в которых КЭ ежегодно заболевают тысячи людей [249]. В Российской Федерации среднемноголетний показатель заболеваемости КВЭ за период 2000–2017 гг. составляет 2,5 на 100 тыс. населения [67].

Человек заражается ВКЭ путём присасывания инфицированного клеща (трансмиссивный путь передачи) [218] или путём употребления в пищу сырого молока и молочных продуктов [205, 248], содержащих ВКЭ (алиментарный путь передачи). Инкубационный период наиболее часто составляет 7–14 дней [147, 155].

Как предполагается, в случае трансмиссивного заражения местом первичного размножения вируса являются кожа и подкожная клетчатка. Вирус проникает в организм позвоночного хозяина (в т. ч. человека) при присасывании переносчика, заражение происходит через слюну клеща [1, 218]. Интересно,

что количество ВКЭ в слюне клеща увеличивается в 10–100 раз во время его прокармливания [84, 181]. В этом контексте слюна клеща играет важную роль в облегчении распространения вирусной инфекции, что обуславливает большой процент случаев заражения ВКЭ трансмиссивным путём.

В меньшей степени распространён путь заражения через молоко и молочные продукты. При алиментарном заражении происходит быстрая фиксация вируса не только в эпителиальных клетках верхнего отдела пищеварительного тракта, но и в тканях желудочно-кишечного тракта [5]. Вирионы ВКЭ выживают в кислой среде желудка до 2 часов, и поэтому инфекционный вирус достигает двенадцатиперстной кишки после приёма инфекционного молока [147]. В число стран, в которых сообщалось о передаче ВКЭ алиментарным путём, входят Австрия, Чешская Республика, Россия, Словакия, Германия, Венгрия, Словения и Польша [74, 197, 247, 248, 250]. Считается, что примерно 1 % всех случаев заболевания КЭ вызваны пищевым заражением, однако данные разных регионов могут значительно варьировать [147, 178].

В. И. Злобин (2010) установил, что на рубеже XX и XXI вв. в РФ зафиксирован исторический максимум заболеваемости КВЭ. Рост заболеваемости обеспечивался главным образом за счёт регионов Урала и Сибири. В регионах Восточной Сибири был отмечен чрезвычайно высокий темп роста заболеваемости: например, только за пять лет (1994–1999 гг.) в Республике Хакасия она выросла в 4 раза, в Республике Бурятия – в 5 раз, в Иркутской области – в 6 раз, в Республике Тыва – в 16 раз [19]. Уровень заболеваемости в дальневосточном регионе не превышал среднероссийского, однако здесь регистрировали наиболее клинически тяжёлый КЭ и отмечали наивысшую летальность. И хотя многими авторами отмечено, что с начала XXI века наблюдается устойчивое снижение заболеваемости, связанное с постепенной деградацией природных очагов на освоенных территориях [4, 20, 21, 23, 28, 30, 31, 48, 50], в 2007–2008 гг. В. И. Злобин отметил тенденцию роста заболеваемости в ряде европейских регионов РФ [19]. Кроме этого, в 2016 г. А. Я. Никитин с соавторами проанализировали эпидемиологическую ситуацию по КВЭ

на территории России за 2015 г. и показали, что число случаев присасывания клещей к людям в большинстве субъектов страны выросло по сравнению со средними многолетними показателями [68]. Следует подчеркнуть, что болезни ежегодно регистрируются во всех федеральных округах страны, имеющих эндемичные территории [25]. Эпидемиологическая ситуация по КЭ в целом продолжает оставаться достаточно напряжённой, особенно в Сибирском, Уральском и Дальневосточном федеральных округах [42]. В 2017 г. наиболее неблагоприятная эпидемиологическая обстановка по КВЭ сложилась, как и в предшествующие годы [21, 25, 62], в Сибирском федеральном округе (СФО). На его долю пришлось 46,3 % от всех зарегистрированных в стране больных КВЭ. Тем не менее, в сравнении с 2016 г. заболеваемость в СФО снизилась на 23,2 % [42]. Кроме того, в 2017 г. была исследована заражённость клещей в Кемеровской области, и их инфицированность ВКЭ была крайне низка [54]. В течение эпидемического сезона 2018 года отмечен рост обращаемости населения по поводу присасывания клещей во всех эндемичных федеральных округах европейской части России. Общий уровень инфицированности клещей в 2018 г. был в 1,5 раза ниже по сравнению с 2017 г. [16]. Тем не менее, среди заболевших в 2018 г. были зарегистрированы 22 случая, которые закончились летальным исходом [16].

По 2019 г. отмечено, что заражённость населения КВЭ в РФ снизилась: по данным управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Иркутской области, в 2019 г. было установлено 58 случаев заражения КВЭ, что в 1,8 раза меньше аналогичного показателя 2018 г. [58].

1.2 Биологическая характеристика вируса клещевого энцефалита

Вирус клещевого энцефалита таксономически относится к царству *Rioviria*, семейству *Flaviviridae* [159]. Согласно отчёту Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) 2018 года, семейство *Flaviviridae* включает в себя

4 рода: *Flavivirus* (53 вида), *Hepacivirus* (14 видов), *Pegivirus* (11 видов), *Pestivirus* (11 видов). ВКЭ входит в самый многочисленный род этого семейства, род *Flavivirus*, типовым видом которого является вирус жёлтой лихорадки, – первый вирус человека, обнаруженный Вальтером Ридом в 1900 г. Также семейство *Flaviviridae* включает возбудителей таких заболеваний, как лихорадка Денге, японский энцефалит, лихорадка Западного Нила, энцефалит Сент-Луис, гепатит С, лихорадка Зика. Существенная гомология между этими вирусами имеет практические последствия в диагностике из-за перекрёстного взаимодействия антител в серологических реакциях [181].

Возбудитель КЭ является РНК-содержащим нейротропным вирусом, способным к длительному сохранению своих вирулентных свойств при замораживании и в 50%-м водном растворе глицерина [36]. Вирус устойчив к низким значениям pH, что способствует пищевому заражению [20, 13, 49]. Вирус в крови или его суспензия в белковом растворе полностью инактивируется при нагревании до 56–60 °C в течение 10–30 мин, погибает при кипячении в течение 2–3 мин. Губительно действуют на вирус УФ-облучение, растворы дезинфицирующих средств – формалина, ацетона, этила [69]. ВКЭ чувствителен также к дезинфицирующему действию хлорной извести и хлорамина с активным хлором в начальной концентрации 0,7 мг/л в течение 10–30 мин и в концентрации 0,1 мг/л – в течение 30–60 мин. Быстрое обеззараживающее действие оказывает лизол – 5%-й раствор убивает ВКЭ через 1 мин [36].

Как и вирионы всех флавивирусов, ВКЭ имеет сферическую форму диаметром до 50–60 нм, покрытую гликопротеиновой оболочкой. Внутри внешней оболочки размещается вирусный капсид – геномный нуклеопротеиновый комплекс, покрытый коровым белком диаметром около 30 нм. В своём составе вирусная частица содержит 68 % белка, 8 % РНК, 17 % липидов и 9 % углеводов [5]. Геном ВКЭ состоит из линейной одноцепочечной молекулы РНК положительной полярности длиной около 10,5 тыс. нуклеотидных оснований (н.о.) [183, 241]. Одна длинная открытая рамка считывания, фланкированная двумя короткими некодирующими

последовательностями, кодирует все вирусные белки [97]. Нетранслируемые области, длины которых составляют около 100 и 400–700 пар оснований соответственно [181], принимают участие в процессе репликации вирусного генома. Трансляция открытой рамки считывания происходит с образованием полипротеина, который впоследствии разрезается клеточными и вирусными протеазами на отдельные структурные и неструктурные белки. На N-конце полипротеина выщепляются структурные белки С (вместе с молекулой РНК формирует нуклеокапсид), рМ (предшественник белка М, поверхностного белка, погружённого в мембрану вириона и участвующего в комплектации белка Е) и Е (поверхностный белок, опосредующий связывание флавивирусов с клеточными рецепторами и слияние мембран вириона и клетки). Затем следуют неструктурные белки вируса, такие как NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5, которые обеспечивают репликацию вирусного генома в клетке. Помимо белков, при процессинге выщепляются пептиды К и 2К [181].

Возбудитель КЭ входит в экологическую группу арбовирусов. Слово «арбовирусы» происходит от английского и означает «arthropod-borne animal viruses» – вирусы животных, переносимые членистоногими. Тип членистоногие включает себя две группы переносчиков флавивирусов – кровососущие комары и клещи. ВКЭ является прототипным для вирусов, переносимых клещами [18, 19]. Филогенетический анализ показал, что клещевые флавивирусы отличаются от вирусов, передающихся комарами; кроме того, было установлено, что клещевые флавивирусы эволюционируют медленнее [143, 203]. Помимо ВКЭ, в группу «клещевых» возбудителей входят вирус шотландского энцефаломиелита овец, вирус омской геморрагической лихорадки, вирус Лангат, вирус Киасанурской лесной болезни, вирус Повассан, вирус Карши, вирус Ройял-Фарм, вирус Алма-Арасан, вирус Алхурма, вирус оленьих клещей [19].

Поскольку прокормителями иксодовых клещей являются определённые виды теплокровных млекопитающих, циркуляция ВКЭ между переносчиком и хозяином происходит в географически очерченной зоне, формируя стабильные природные очаги инфекции. Их сохранение обеспечивается за счёт непрерывной

передачи возбудителя между заражёнными и незаражёнными клещами и теплокровными позвоночными животными, обитающими на конкретной территории. Учение о природной очаговости было разработано русским учёным Е. Н. Павловским в 1930-х годах [43, 44, 45] и с тех пор получило дальнейшее развитие [168, 177, 196, 211, 212]. Непрерывное взаимодействие популяции возбудителя с популяциями его естественных хозяев и внешней средой представляет собой эпизоотический процесс, обеспечивающий существование возбудителя [37].

Чаще всего переносчик инфицируется, получая возбудителя при его питании на заражённых млекопитающих с выраженной виремией [8, 20, 23]. Эта теория основана на исследованиях трансмиссии, связанных с лабораторным заражением позвоночных хозяев посредством инокуляции [192]. Вирус размножается в кишечнике клеща сразу после присасывания, а затем достигает всех органов, в том числе и слюнных желёз [8]. Слюна клеща, впрыскиваемая во время присасывания, обладает гистолитическими и гемолитическими свойствами, содержит антикоагулянты, анестезирующие, сосудорасширяющие и другие вещества, оказывающие токсическое и аллергизирующее действие [8]. Виремическая трансмиссия является одним из первых описанных способов передачи ВКЭ. Отсекающий титр ВКЭ в крови, при котором вирус может заразить питающегося клеща, составляет 2–2,5 lg LD₅₀/0,03 мл [208].

Однако описан и альтернативный механизм передачи вируса от инфицированных клещей к неинфицированным при подпороговых титрах возбудителя в крови, когда на общем авиремическом хозяине одновременно питаются инфицированные и неинфицированные особи [115]. Было показано, что наличие виремии у животного-донора вовсе не обязательно для обмена ВКЭ: он может совершаться транспиально, т. е. за счёт обмена заражённой слюной между рядом питающимися особями [1]. Кроме этого, передача ВКЭ может происходить дистантно, т. е. между особями, питающимися на животном без виремии [2]. При таком типе передачи вирус поступает в организм паразитирующих клещей с лимфоцитами хозяина-млекопитающего,

мигрирующими в очаг воспаления [10]. Невиремическая трансмиссия является потенциально гораздо более эффективным механизмом передачи, чем виремическая, поскольку она не требует развития виремии у хозяина, и вирус может передаваться непосредственно между клещами, даже когда животное-прокормитель обладает иммунитетом к ВКЭ и не способно поддерживать достаточный титр вируса в крови [262]. Непосредственная передача вируса от клеща к клещу без виремии в крови хозяина, несомненно, имеет широкое распространение в природе, обеспечивая эффективное инфицирование особей одной или разных фаз развития при их совместном прокармливании. Именно такая передача вируса от нимф к личинкам, которые совместно питаются на одном и том же грызуне-хозяине, считается главным событием цикла передачи ВКЭ, поскольку как раз на этом этапе обеспечивается поддержание очага ВКЭ [181]. Помимо этого, было отмечено существенное эпидемиологическое значение неvirемической передачи и показано, что, даже исключив все остальные пути инфицирования переносчиков, ВКЭ сможет существовать в природе только за счёт неvirемической трансмиссии [115, 116, 262].

Некоторые учёные также относят половой путь передачи ВКЭ от самцов к самкам в процессе спаривания к достаточно эффективным способам, за счёт которого обеспечивается трансмиссивная передача и попадание вируса в яйца. Ими было продемонстрировано, что в результате половой передачи может быть заражено до 50 % самок *I. persulcatus* [51].

Иксодовые клещи способны также к вертикальной трансмиссии инфекционного агента. Термин «вертикальная трансмиссия» в применении к КЭ объединяет два процесса – с одной стороны, передачу микроорганизмов от самки потомству (трансовариальная передача), а с другой стороны, сохранение инфекции в процессе метаморфоза одной и той же особи клеща (трансфазовая передача) [28]. Трансовариальная передача характеризуется передачей возбудителя от инфицированных самок к их потомству через оплодотворённое яйцо, а из него – в развивающуюся личинку, нимфу и взрослую особь [105]. Однако данный механизм передачи ВКЭ осуществляется с низкой

эффективностью (1–10 % случаев [8, 51] независимо от субтипа вируса), а эффективность трансвариальной передачи напрямую зависит от концентрации инфекционного вируса в самке. Показано, что концентрация ВКЭ в самках 6–7 lg LD50 обеспечивает 100%-ю эффективность трансвариальной трансмиссии, тогда как при концентрации 3 lg LD50 трансвариальная передача не наблюдалась [64]. По-видимому, трансвариальная трансмиссия сама по себе не в состоянии долго поддерживать природный очаг ВКЭ в природе без подключения в циркуляцию теплокровных животных.

Механизм проникновения ВКЭ в организм хозяина до сих пор не вполне ясен. Считается, что прикрепление и проникновение вируса в клетку связано с эндоцитозом через клеточные рецепторы, специфичные для белков вирусной оболочки. Отечественными исследователями установлено, что в человеческом организме рецепторами для ВКЭ являются ламининовый рецептор и интегрин, содержащий бета-1-цепь [34]. В мембране образуется отверстие, и вирусная частица попадает внутрь клетки в виде эндосомы. Низкий pH эндосомального пути индуцирует слияние вирионной и клеточной мембран [181]. После стадий связывания с клеткой, проникновения вирионов в клетку, слияния и расплавления мембран происходит раздевание нуклеокапсида и освобождение вирусного генома непосредственно в цитоплазме, что является сигналом для начала репликативного цикла.

Клеточные протеазы трансформируют образующийся вирусный полипротеин в РНК-зависимую РНК-полимеразу, вирусную протеазу и структурные белки. Полимераза копирует +РНК-цепь в виде репликативных –РНК-цепей, на основе которых синтезируются как дочерние геномные копии +РНК ВКЭ для формирования новых вирионов, так и матричные +РНК для трансляции полипротеина [101]. Синтезированная плюс-цепь вирусной РНК комплексуется с *preM*-, *M*- и *C*-белками в вирусный нуклеокапсид. Синтез минус- и плюс-цепей РНК является ассиметричным процессом: минус-цепи служат матрицей для нескольких раундов синтеза плюс-цепей [101]. Было установлено, что в процессе репликации вируса вторых образуется в 10–100 раз больше, чем первых

[181]. Вирионы созревают по мере передвижения из шероховатого эндоплазматического ретикулума в гладкий, затем в аппарат Гольджи и, наконец, в плазматическую мембрану клетки [5]. Окончательное созревание инфекционного вируса завершается в процессе его транспортировки через клеточную мембрану.

1.3 Циркуляция вируса клещевого энцефалита в природе

Согласно учению о природной очаговости Е. Н. Павловского [43, 44, 45], природный очаг не может существовать без ставшей уже классической триады: возбудителя, его переносчиков и животных-резервуаров. В случае с КЭ резервуарами вируса являются теплокровные позвоночные животные, обеспечивающие его циркуляцию и сохранение в природе, а переносчиками инфекции от животных к людям считаются клещи. В этом контексте акцент делается главным образом на медицинской роли участников природного очага. В последнее время как в России, так и за рубежом увеличивается интерес к экологическим аспектам циркуляции флавивирусов [2, 56, 85, 118, 133, 265]. В данном случае и позвоночные-резервуары, и беспозвоночные переносчики рассматриваются как естественные хозяева вируса, при этом разные виды хозяев играют разную роль в поддержании циркуляции вируса. В нашей работе мы были сосредоточены главным образом на изучении обитания вируса в естественных условиях, поэтому во многих случаях термин «хозяин» используется как по отношению к млекопитающим, так и по отношению к клещам. В двух последующих параграфах будет рассмотрен спектр беспозвоночных и позвоночных хозяев ВКЭ и проанализированы результаты исследований циркуляции вируса в природе, опубликованные к настоящему моменту.

1.3.1 Основные беспозвоночные хозяева вируса клещевого энцефалита

Клещи являются основными переносчиками и резервуарными хозяевами ВКЭ благодаря разнообразию их прокормителей среди позвоночных, внутриклеточному перевариванию крови, длинному жизненному циклу,

превышающему продолжительность жизни мелких млекопитающих, а также трансвариальной и трансстадиальной передаче ВКЭ [56]. Основным беспозвоночным резервуаром, поддерживающим существование возбудителя КЭ, являются клещи семейства Ixodidae рода *Ixodes* – *I. persulcatus* Shulze, 1930 (преимущественно в азиатском регионе России) и *I. ricinus* L., 1758 (преимущественно в европейском регионе). На территории РФ хозяевами вируса реже могут быть и такие виды иксодовых клещей, как *Haemaphysalis concinna*, *H. japonica*, *Dermacentor nuttalli/silvarum*, *D. reticulatus*, *D. marginatus* [19], а также *I. pavlovskyi* как наиболее распространённый вид клеща в Западной Сибири наряду с *I. persulcatus* [85]. В Европе и Азии существуют очаги ВКЭ, где резервуарами могут быть клещи *Haemaphysalis* spp., а также *I. ovatus* [238, 239].

Европейский субтип ВКЭ передаётся главным образом клещом *I. ricinus* [187], тогда как вектором для сибирских и дальневосточных субтипов является *I. persulcatus* [148, 187]. В Японии дальневосточный субтип ВКЭ был выделен из *I. ovatus* [238].

Клещ *I. ricinus* (лесной клещ) предпочитает в качестве станций обитания лиственные, хвойно-лиственные леса и открытые пространства с кустарниковой растительностью. Он обитает практически во всех странах Западной Европы, в западной части России до Волги, на Кавказе, в Иране, Турции и в странах Северной Африки: Тунисе, Марокко, Алжире [175]. Помимо КЭ, этот клещ является переносчиком таких заболеваний, как клещевой боррелиоз (*Borrelia burgdorferi*), марсельская лихорадка (*Rickettsia conorii*) и туляремия (*Francisella tularensis*) [9]. Клещ *I. persulcatus* (таёжный клещ) – лесной обитатель, но встречается также на лугах и в зарослях кустарников. Он широко распространён в России, Белоруссии, странах Балтии, Финляндии, Китае, Северной Корее и Японии. Ареал занимает значительную область в Европейской части России, в Сибири и на Дальнем Востоке [60]. Интенсивное изучение этого вида клеща началось с конца 1930-х годов, когда была установлена его ведущая роль в качестве переносчика возбудителя КЭ [17, 43, 44, 63]. Позже была показана его роль в качестве переносчика других инфекций, возбудителями которых

являются риккетсии, бактерии, простейшие [3, 29]. *I. persulcatus* является наиболее эпидемиологически важным вектором для ВКЭ в Сибири и на Дальнем Востоке и составляет 80–97 % всех видов клещей во многих природных очагах [187]. Заражение ВКЭ в некоторых районах, где *I. persulcatus* не является преобладающим видом, вероятно, было связано с другими видами клещей, такими как *Dermacentor pictus*, *D. silvarum* и *Haemaphysalis concinna* [20]. ВКЭ также был спорадически выделен по меньшей мере из 15 других видов клещей, а также из многих других паразитов (муха, блоха, вши, комары) [20, 53], но их роль в передаче вируса человеку не была продемонстрирована. Тем не менее, можно предположить, что даже случайное размножение вируса в других членистоногих может привести к отбору новых вирусов с изменёнными патогенными характеристиками для людей [148]. *I. persulcatus* является, в том числе, переносчиком клещевого боррелиоза (*Borrelia burgdorferi* s.l.), Кулихорадки (*Coxiella burneti*), бабезиоза (*Babesia microti*), туляремии (*Francisella tularensis*), клещевой возвратной лихорадки (*Borrelia miyamotoi*), гранулоцитарного анаплазмоза (*Anaplasma phagocytophilum*) и моноцитарного эрлихиоза человека (*Ehrlichia chaffeensis/muris*).

Цикл передачи ВКЭ в природе начинается с нападения клеща на теплокровного прокормителя. Большинство видов иксодовых клещей имеют три стадии развития (личинка, нимфа, имаго), и каждая морфологическая фаза клеща питается на разных особях и нередко на разных видах хозяина. На каждой стадии развития клещу требуется питаться кровью на подходящем для конкретной стадии хозяине, чтобы перейти на последующую стадию развития [71]. При заражении ВКЭ клещи остаются инфицированными в течение всего жизненного цикла [147]. Считается, что нимфы являются наиболее важной стадией передачи ВКЭ, так как они более многочисленны, чем взрослые [238], и поэтому играют важную роль для неvirемической передачи ВКЭ. В большинстве случаев иксодовые клещи на каждой фазе своего развития питаются всего один раз [8]. После завершения питания клещ отпадает во внешнюю среду, проходя дальнейшее развитие в почве, растительной подстилке или норах (гнездах) хозяев [71]. Питание клеща должно

длиться 2–8 дней, чтобы взрослый клещ продолжал развиваться, и 4–20 дней, чтобы имаго мог откладывать яйца [117]. Как правило, самки иксодового клеща откладывают от нескольких тысяч до 17 тысяч яиц. После первой и единственной откладки яиц самки погибают [8].

Клещи как переносчики и беспозвоночные резервуары вируса играют важную роль для отбора штаммов ВКЭ с определёнными свойствами. Было выдвинуто предположение, что различные виды клещей обеспечивают селекцию штаммов ВКЭ с высокой и низкой вирулентностью, поскольку была обнаружена корреляция между тяжестью заболевания и распространённостью клещей *I. persulcatus* или *H. concinna* [35]. В годы высокой распространённости *I. persulcatus* тяжёлые заболевания и смертельные случаи были более частыми по сравнению с теми годами, когда *H. concinna* составляли значительную часть популяций клещей. Присутствие обоих видов клещей одновременно в одном очаге коррелирует с равными уровнями тяжёлых и лёгких форм КЭ на Дальнем Востоке [35]. Показано, что существуют штаммы ВКЭ дальневосточного субтипа с различной степенью вирулентности, у которых в геноме могут быть мутации, оказывающие влияние на тяжесть течения инфекционного процесса [6, 7, 26, 38].

Влияние клещей на биологические свойства ВКЭ также было продемонстрировано в лабораторных экспериментах. Было показано, что серийные пассажи неклонированного ВКЭ у *I. ricinus* сопровождались постепенным снижением вирулентности вируса для мышей и исчезновением гемагглютинирующей активности, что позволяет предположить влияние фенотипических изменений, возникающих в результате отбора, на рецептор вирусной оболочки белка [148]. В итоге секвенирование гликопротеина оболочки Е показало различие в одной аминокислоте между исходным и адаптированным к клещу вирусом [96].

1.3.2 Основные позвоночные хозяева вируса клещевого энцефалита

Непрерывная циркуляция ВКЭ между беспозвоночными и позвоночными резервуарными хозяевами – участниками паразитарной системы – это феномен, имеющий чрезвычайно важное значение в природных и синантропных средах обитания. Обилие видов хозяев, большое количество циклов передачи ВКЭ и его адаптация к различным хозяевам обеспечивают стабильность всей паразитарной системы [85, 169, 218].

Прокормителями клещей являются многие позвоночные животные, включая млекопитающих, птиц, рептилий и земноводных [13, 60], но это не обязательно означает, что все они будут обладать компетенцией в отношении ВКЭ (т. е. поддерживать циркуляцию ВКЭ в естественной среде). Животные, обладающие компетенцией к ВКЭ, считаются его резервуарными хозяевами, и в естественных очагах эти резервуары должны быть доступны в больших количествах в сочетании с высокой скоростью размножения и быстрой сменой поколений [238]. Резервуарным хозяевам для эффективной передачи вируса необходимо вырабатывать высокую виремию в течение довольно длительного периода времени, чтобы быть способными заразить тех особей клещей, которые в дальнейшем будут прокармливаться на них [89, 139], но при этом животные-резервуары не должны становиться клинически больными. Второй вариант – они должны быть способны поддерживать неvirемическую передачу между клещами при их совместном прокармливании [78, 115, 139, 171, 172].

Наиболее важными естественными теплокровными хозяевами ВКЭ и прокормителями иксодовых клещей являются дикие млекопитающие мелких и средних размеров: прежде всего, мышевидные грызуны [189] насекомоядные и зайцеобразные [27]. Эти животные могут выступать в качестве резервуаров для вируса, не развивая клинических симптомов [127].

Большинство грызунов ввиду своей многочисленности и способности к быстрой сменяемости поколений считаются основными прокормителями преимагинальных стадий клещей и важными резервуарами возбудителей

клещевых инфекций, в том числе ВКЭ. В экологическом отношении эти мелкие млекопитающие обладают высокой приспособленностью к самым разнообразным комплексам жизненных условий – от крайних пределов наземной жизни в полярных странах до экватора и от равнин до снеговой линии гор [11]. Многие грызуны являются синантропными животными и вместе с другими мелкими млекопитающими и птицами зачастую остаются единственными доступными естественными хозяевами для клещей в городских условиях [186].

Из мелких грызунов наибольшее значение как прокормители клещей по всей лесной зоне имеют землеройковые, в частности бурозубки (р. *Sorex*), а также лесные, или рыжие, полёвки рода *Myodes* (*Clethrionomys*): рыжая (*M. glareolus*, Schreber, 1780), красная (*M. rutilus*, Pallas, 1779) и красно-серая (*M. rufocanus*, Sundevall, 1846), – поскольку они наиболее адаптированы к жизни в лесу [28, 30]. Эти виды заселяют зоны тайги и широколиственных лесов.

На территории Восточной Сибири наиболее значимыми резервуарами ВКЭ и прокормителями таёжных клещей являются красно-серая полёвка, полёвка-экономка (*Microtus oeconomus*, Pallas, 1776), восточноазиатская лесная мышь (*Apodemus peninsulae*, Thom, 1862) и сибирский бурундук (*Tamias sibiricus*, Laxmann, 1769) [20, 59].

Следует отметить, что определённые виды мелких млекопитающих передают определённые субтипы ВКЭ с привязкой к их географическому распределению. По мнению некоторых российских учёных, селективная роль разных видов позвоночных хозяев должна заключаться в поддержании или элиминации из цикла циркуляции того или иного субтипа ВКЭ [57]. Так, основными хозяевами и резервуарами для европейского субтипа ВКЭ являются грызуны *Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus* и *Myodes* spp., для сибирского субтипа – *A. agrarius* и *A. peninsulae*, для дальневосточного – *M. rufocanus* и *Microtus arvalis* [239]. Кроме того, была обнаружена зависимость между тяжестью заболевания и видом грызуна: красно-серая полёвка *M. rufocanus* оказалась универсальным хозяином для штаммов с высокой и низкой

вирулентностью, тогда как обыкновенная полёвка *M. arvalis* ассоциировалась только со штаммами с низкой вирулентностью [148].

Ранее считалось, что основной способ передачи ВКЭ клещам заключается в прямом заражении во время их прокармливания кровью виремических грызунов [93]. Для этого мелкие млекопитающие развивают достаточный уровень виремии [129, 198, 220]. В то же время известно, что такой уровень формируется далеко не у всех зверьков и лишь на короткое время [64, 154, 195, 210, 220]. В этой связи с течением времени стало ясно, что для поддержания циркуляции ВКЭ в природных очагах одного механизма виремической передачи недостаточно. В настоящее время известно, что полный цикл передачи ВКЭ наиболее эффективно происходит посредством невиремической трансмиссии, которая поддерживается в первую очередь грызунами родов *Myodes* и *Apodemus* [78, 179, 220, 271]. По-видимому, такие млекопитающие более важны для невиремической передачи, чем хозяева более крупных размеров. Ввиду ограниченного пространства, доступного для успешного присасывания клещей на мелких грызунах, любые личинки клещей будут «вынуждены» кормиться очень близко к потенциально инфицированным клещам, что, по-видимому, делает невиремическую передачу у этих млекопитающих сравнительно более эффективной [271]. При этом некоторые экспериментальные данные показывают, что у полёвок развиваются более низкая виремия и менее эффективная передача вируса по сравнению с грызунами рода *Apodemus* [131]. Заражённость восточноазиатских мышей *A. peninsulae* ВКЭ может превышать 20 % [66]. Кроме того, мышь *A. peninsulae* склонна к синантропизму [65], поэтому изучение особенностей взаимодействия данного вида с ВКЭ в паразитарной системе «теплокровное животное — клещ — теплокровное животное» заслуживает повышенного внимания.

До сих пор не до конца ясно, почему организм резервуарного хозяина не развивает клинические симптомы ВКЭ и при развитии соответствующего уровня виремии. Некоторыми авторами указывается, что, получив вирус, организм восприимчивого к вирусу животного синтезирует нейтрализующие

антитела, которые ограничивают его вирусемию, таким образом, дальнейшая инфекция не развивается [8]. В то же время существует мнение, что у некоторых видов полёвок (*Myodes rutilus*, *M. glareolus*, *Microtus arvalis*) может развиваться персистирующая инфекция КЭ без явных клинических симптомов [10, 220, 244]. При этом возбудитель способен длительное время, сопоставимое с продолжительностью жизни одной генерации полёвок, сохраняться в организме зверьков в непатогенной форме [10]. Ряд учёных связывают взаимную адаптацию вируса и его природных хозяев с селекцией штаммов возбудителя с определёнными свойствами, подчёркивая тем самым вклад млекопитающих в региональные различия популяций вируса по степени их нейровирулентности [41]. Также есть мнение, что основную роль при непрерывной циркуляции вируса выполняют не позвоночные животные, а клещи, поскольку они обладают высоким репродуктивным потенциалом, а за счёт длительного жизненного цикла возбудитель в этих беспозвоночных резервуарах сохраняется значительно дольше [8].

Клещи прокармливаются и на таких крупных млекопитающих, как козы, коровы, собаки, лошади, олени, овцы и свиньи, и могут передавать ВКЭ этим видам. Однако ни один из них не играет существенной роли для поддержания ВКЭ в клещах [195, 254]. Такие животные выполняют роль дополнительных (или индикаторных) хозяев ВКЭ. Индикаторные хозяева не могут передавать вирус другим клещам, поскольку они развивают только кратковременную вирусемию с низким титром вируса. Так, было показано, что олени не развивают уровень вирусемии, достаточный для вирусемической передачи [135, 173]. Предполагается, что они могут поддерживать невирусемическую передачу ВКЭ ввиду большого количества клещей, прокармливающихся на одной особи в непосредственной близости, но не существует экспериментальных или прямых доказательств, подтверждающих такую гипотезу [174]. Косули, овцы, козы и крупный рогатый скот также пока не были признаны компетентными хозяевами ВКЭ, поддерживающими невирусемическую передачу вируса [195, 210]. Косвенно индикаторные хозяева поддерживают циркуляцию вируса, позволяя клещам

размножаться в большом количестве [92]. Кроме того, они являются ценными объектами для выявления антител к ВКЭ при эпидемиологических исследованиях [221, 238].

Отмечалось, что инфекция ВКЭ у копытных иногда может протекать в форме тяжёлых неврологических расстройств [228], однако, по мнению других учёных, крупные дикие животные, такие как кабаны, лисы, олени, не проявляют каких-либо клинических признаков при заражении ВКЭ [111]. В разных работах также сообщалось, что у косуль, коз, овец и крупного рогатого скота вырабатывается сильный иммунный ответ на инфекцию ВКЭ [107, 119, 140, 229]. Также было показано, что у собак инфекция ВКЭ обычно протекает бессимптомно, при этом вырабатывается специфичный иммунитет [201]. В случае заболевания у них наблюдаются очень тяжёлые клинические симптомы, которые ведут к практически однозначному смертельному исходу. Спонтанная заражённость вирусами отмечена и у ряда птиц: рябчиков, скворцов, поползней, береговых ласточек и т. д. [8]. В ходе дальнейших исследований в отношении птиц в литературе утвердилось мнение об их важной роли в поддержании природных очагов ВКЭ и диссеминации вируса [20, 222].

Случайные хозяева могут быть заражены ВКЭ как в лабораторных условиях, так и при случайном стечении обстоятельств в естественной среде и развиваться при этом вирусемию. Но, как правило, они не участвуют в циркуляции вируса и не являются прокормителями клещей [238]. По всей видимости, случайными хозяевами являются представители отряда Рукокрылые и класса Пресмыкающиеся, виды которых не так многочисленны, как виды грызунов, поэтому они гораздо реже подвергаются нападению клещей. Таким образом, они имеют сравнительно меньший шанс иметь контакт с вирусом. Тем не менее, в литературе упоминалось, что для клеща *I. ricinus* рептилии могут служить прокормителями личинок и нимф [40, 46, 88]. В ходе лабораторных экспериментов было также продемонстрировано, что ящерицы способны поддерживать репродукцию ВКЭ, хотя и с невысокими титрами инфекционного вируса [146]. Однако имеются данные об отсутствии выработки специфичных

антител к ВКЭ у ряда рептилий [229]. Кроме того, было показано, что репродукцию ВКЭ и вируса Кьясанурской лесной болезни могут поддерживать в лабораторных экспериментах летучие мыши [149, 193, 199]. Другие учёные отмечали, что в организме этих млекопитающих можно обнаружить антитела к ВКЭ [153]. Следует упомянуть, что, по мнению некоторых российских авторов [22], летучие мыши и ящерицы могут играть роль дополнительных резервуаров ВКЭ в природе.

1.4 Современные подходы к изучению биологии вируса клещевого энцефалита

Широкое распространение ВКЭ в Европе и Азии, тяжёлые клинические проявления клещевого энцефалита, а также необходимость разработки эффективных методов лечения и профилактики заболевания стимулируют быстрое развитие экспериментальных исследований биологии возбудителя этого заболевания. Среди всего массива работ заметно выделяются по интенсивности развития два направления изучения ВКЭ, которые очень тесно связаны между собой, взаимно дополняют друг друга, однако отличаются как основным объектом исследований, так и методическим инструментарием. Одно направление сосредоточено на углублённом изучении молекулярно-биологических, прежде всего геномных, характеристик самого вируса и описании вирусных популяций как в природных, так и в экспериментальных условиях. Второе направление скорее ориентировано на создание и изучение контролируемых моделей естественных процессов взаимодействия вируса и организма позвоночных и беспозвоночных хозяев. Далее мы постараемся кратко охарактеризовать современный мировой уровень исследований по этим направлениям.

1.4.1 Анализ генома вируса клещевого энцефалита

Определение последовательности оснований в молекуле ДНК обычно проводится с использованием метода терминации дидезокси-цепи,

разработанного Фредом Сэнгером и его коллегами из Кембриджа. Последовательность генома ДНК фага фХ174 была определена этой группой через шесть лет после первого определения последовательности ДНК, которая сама была из вируса: 12 н.о. ДНК фага лямбда. Теперь, когда технологии секвенирования вирусных геномов и определения организации генома легкодоступны, степень сходства между вирусными геномами может быть оценена с помощью компьютерных программ и представлена на диаграммах, известных как филогенетические деревья, поскольку они показывают вероятную филогению (эволюционное развитие) вирусов [94]. С помощью таких компьютерных программ, как Artemis и BLAST, можно не только определять степень сходства между вирусными геномами, но и получить много другой полезной информации. Например, можно найти открытые рамки считывания, которые могут быть переведены в аминокислотные последовательности вирусных белков и позволят определить характеристики и функции белков. Гидрофобные последовательности могут указывать на мембранную ассоциацию; последовательность Gly-Asp-Asp может указывать на активность РНК-зависимой РНК-полимеразы [94].

В изучении вируса клещевого энцефалита именно анализ последовательностей вирусных геномов или их фрагментов послужил основой для создания всей современной внутривидовой классификации вируса. Прежде всего, изучение гена белка Е позволило выделить три основных субтипа вируса и идентифицировать 21 маркерную аминокислотную замену, специфичную для каждого субтипа [194, 227]. Далее расширение выборки геномов позволило описать ранее неизвестные эволюционных линии ВКЭ – Софьин, Oshima, Shenzang [104], Васильченко, Заусаев [52, 98], Балтийская [266], Обская [190]. На основе анализа полногеномных последовательностей рядом авторов предложено выделить два дополнительных субтипа – «886-84» [14, 72] и Тибетский [77]. Анализ генома также является основным инструментом для характеристики общего размера и динамики популяции вируса. Так, исследование максимально доступного количества фрагментарных

последовательностей ВКЭ позволило предположить, что массовое распространение и диверсификация вируса происходят в течение последних 300 лет, причём в последние 50 лет наблюдается увеличение размера популяций ВКЭ от 20 % (Сибирский субтип) до ~800 % (Европейский субтип) [253]. При этом изучение фрагментов последовательностей гена Е ВКЭ, изолированных в Восточной Сибири с 1961 по 2011 г., указывает на снижение генетического разнообразия ВКЭ в течение этого же периода времени [216].

Фрагментарный и полноразмерный анализ генома ВКЭ стал основой для раскрытия молекулярно-биологических механизмов, обеспечивающих как жизненный цикл вируса, так и его взаимодействие с разными позвоночными и беспозвоночными хозяевами. Было установлено, что адаптация к новым хозяевам вызывает точечные мутации белка Е в аминокислотных позициях 51, 67, 84, 122, 123, 158, 159, 201, 202, 203, 233, 253, 295, 310, 367, 387, 429. Варианты с такими мутациями выявлены среди всех субтипов ВКЭ и обнаруживаются как в природных популяциях вируса [138], так и при адаптации к культурам клеток млекопитающих ВНК-1 [73, 82], СПЭВ, НЕК293, Neuro2a [81], а также иксодовых клещей [259]. Анализ полногеномных последовательностей ВКЭ от больных людей с разными клиническими формами заболевания выявил 17 аминокислотных позиций полипротеина, вариабельность которых коррелировала с тяжестью и формой проявления инфекции. Наибольшее влияние предположительно имеют 4 замены в белках С, Е и NS3 [104].

В последнее десятилетие всё более широкое распространение получают методы анализа вирусных геномов, основанные на технологиях «высокопроизводительного секвенирования» (next generation sequencing, NGS) или высокопроизводительного секвенирования (high-throughput sequencing). Данная группа методов включает несколько технологических платформ, которые объединяет принцип множественного параллельного секвенирования фрагментов генома с последующим их объединением в геномную последовательность с помощью биоинформационных методов [217]. Полученная при этом информация характеризует не только мажорную популяцию вируса,

но и большинство минорных вариантов, представленных в общем геномном пуле. Применение этого подхода в изучении ВКЭ позволило не только проанализировать «усреднённую» последовательность генома, но и описать квазивидовой состав вирусных популяций в лабораторных моделях – культурах клеток млекопитающих [109] и клещей [252]. Также с помощью этого подхода было продемонстрировано наличие «репликативной эволюционной памяти» в популяциях ВКЭ [128]. При адаптации вируса к культуре клеток клещей выявлены мутации во всех белках вируса с наиболее значимыми изменениями в белках E, NS2A и NS3 [128, 252].

1.4.2 Современные подходы к моделированию инфекции вируса клещевого энцефалита

Исторически первыми моделями для изучения ВКЭ были животные, прежде всего лабораторные мыши. В дальнейшем был разработан ряд моделей *in vivo*, включая клещей (*Ixodes* sp., *Rhipicephalus* sp., *Amblyomma* sp.), мышей, полёвок, хомяков, овец и нечеловекообразных приматов. При использовании моделей *in vivo* возможна более общая характеристика инфекционного процесса, поскольку данная модель отражает весь спектр реакций целостного организма. И, что немаловажно, при проведении подобного рода исследований есть возможность учесть влияние приобретённого организмом иммунитета к инфекции. Недостатком метода является то, что это дорого, долго, а на результаты влияет большое количество биологических факторов, что затрудняет их интерпретацию. К тому же в моделях *in vivo* крайне сложно исследовать механизмы протекания инфекции на внутриклеточном уровне. Хотя клеточные модели *in vitro* не всегда повторяют сценарии *in vivo*, они являются экономически эффективными, позволяют строго контролировать условия эксперимента и имеют меньше технических погрешностей. Данная система позволяет с высокой степенью достоверности охарактеризовать все основные стадии вирусного жизненного цикла, а также изучить ответ клетки-хозяина на вирусную инфекцию.

1.4.2.1 *In vivo* модели вируса клещевого энцефалита

Млекопитающие

Для исследования особенностей патогенеза ВКЭ существуют несколько моделей животных. Чаще всего это эмбрионы цыплят, сирийские золотистые хомячки, овцы, мыши и обезьяны. ВКЭ хорошо размножается в эмбрионах кур, однако они обычно умирают через 4–7 дней после инокуляции [232]. Считается, что восприимчивость к летальной активности ВКЭ зависит от возраста зародыша с яйцом и температуры инкубации [83, 232]. Возрастное снижение восприимчивости к ВКЭ предположительно объясняют развитием способности эмбриональных клеток вырабатывать интерферон (ИФН) [83, 232]. Сирийские золотистые хомячки чувствительны к инфекции ВКЭ, однако взрослые хомяки проявляют пониженную восприимчивость [251]. Сероконверсия и развитие гистопатологических изменений в мозге инфицированных хомяков были продемонстрированы также в случае скрытой инфекции [234].

В одном из ранних исследований ВКЭ для овец было показано, что подкожная инокуляция ВКЭ овцам приводит к развитию регулярной виремии и экскреции вируса с молоком [144, 145], при этом вирус был обнаружен в основном в органах лимфатической системы, где он сохранялся в течение всего нескольких дней после заражения. В более поздних исследованиях указывалось, что ВКЭ не распространяется среди овец и контролируется иммунным ответом, а также способен уменьшить тяжесть заболевания и виремию сопутствующей флавивирусной инфекции при совместном заражении с вирусом шотландского энцефаломиелита овец [161]. В дальнейшем с использованием овец была разработана и протестирована кандидатная вакцина против ВКЭ для ветеринарного применения [108].

Сообщалось об экспериментальных инфекциях макак ВКЭ и родственными флавивирусами (вирус Киасанурской лесной болезни, вирус Повассан) [130, 158, 200, 233]. Обезьяны *Macaca mulatta* менее чувствительны к инфекции ВКЭ, чем *M. cynomolgus*. Внутрицеребральная или интраспинальная инокуляция ВКЭ

приводит к развитию клинических и гистопатологических признаков энцефалита [251]. Подкожная инокуляция ВКЭ у обезьян *M. rhesus* приводит к клинически неизвестной инфекции с вирусемией и сероконверсией [233]. При разработке живой аттенуированной вакцины некоторые штаммы ВКЭ проходили испытания на безопасность на обезьянах и людях-добровольцах [24, 49, 53].

Лабораторные мыши представляют наиболее практичные и часто используемые модели на животных для КЭ, так как большинство лабораторных штаммов мышей чувствительны к инфекции ВКЭ, и при инокуляции вирулентными штаммами ВКЭ развивается смертельная инфекция центральной нервной системы, которая напоминает тяжёлые случаи КЭ у людей [132, 184]. Мыши, подкожно инокулированные ВКЭ, являются наиболее легкодоступной моделью человеческого КЭ [251, 269]. Активное применение этих животных в исследованиях флавивирусов обусловлено их небольшим размером, низкой стоимостью и высокой скоростью размножения. Мыши способствовали выяснению нескольких аспектов патогенеза ВКЭ. Кроме того, они являются ценной моделью для оценки вакцин и противовирусных кандидатов [100].

Белые мыши хороши при изучении болезни человека, но они плохо применимы для изучения естественных процессов циркуляции ВКЭ. Участники природного очага, прежде всего мышевидные грызуны, будут более подходящими моделями, способными отразить ход естественной флавивирусной инфекции. Для изучения особенностей взаимодействия ВКЭ с некоторыми из его предполагаемых хозяев-естественных резервуаров были использованы рыжие полёвки *Myodes glareolus* [157, 244]. В работах показано, что в большинстве случаев у этих грызунов клинические симптомы в течение инфекции не проявляются. Результаты показывают хорошую адаптацию ВКЭ к полёвкам при обнаруживаемой репликации вируса, что подтверждает важную функцию этих грызунов в качестве резервуарных хозяев ВКЭ и делает их привлекательной моделью для изучения закономерностей вирусной инфекции в условиях, приближенных к естественным. Рыжие полёвки также были использованы в качестве моделей при исследованиях невирусной трансмиссии, так же,

как и желтогорлая и европейская лесная мыши [262]. Было отмечено, что такой несистемный путь передачи вируса, как неvirемическая трансмиссия, зависит от репликации ВКЭ в определённых иммунокомпетентных клетках кожи, и только некоторые виды позвоночных, особенно мыши рода *Apodemus*, чувствительны к этому [179]. Поэтому грызуны, в частности полёвки и лесные мыши, являются хорошими инструментами для моделирования естественной инфекции ВКЭ.

Клещи

В лабораторных условиях были смоделированы жизненные циклы для множества отдельных видов иксодовых клещей, в частности для особей таких видов, как *Hyalomma marginatum* [136, 235], *Ixodes scapularis* [163, 264], *Rhipicephalus appendiculatus* [182], *Rhipicephalus sanguineus* [151, 240], *Dermacentor silvarum* [91, 243], *Ixodes persulcatus* [123] и многих других. При разработке лабораторной колонии *I. persulcatus* клещи прокармливались на сирийских хомячках, а напитавшихся клещей, которые упали с животных, собирали и содержали, чтобы они могли перелинять. Выращивание клещей проводили в инкубаторе при 20 °C при относительной влажности 95 % и 12-часовом режиме фотопериода. Подобная лабораторная колония может способствовать исследованию роли молекул, выделенных из клещей, в передаче инфекционного агента, а также использоваться для идентификации потенциальных противоклещевых вакцин и акарицидных целевых молекул [123]. С использованием клещей *I. ricinus* была разработана модель, которая позволяет исследовать временную закономерность виремии у хозяина с применением ксенодиагностики (последовательное прокармливание клещей на заражённом хозяине с последующим тестированием с использованием ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) получающихся в результате суспензий напитавшихся клещей) [261]. Для клещей *I. ricinus* была исследована неvirемическая трансмиссия в лабораторных условиях [262]. Позже было продемонстрировано, что эффективность неvirемической передачи ВКЭ между клещами *I. ricinus*

в значительной степени определяют структурные белки вириона [260]. Колонии клещей могут быть использованы также при моделировании естественных циклов передачи ВКЭ, что будет способствовать изучению механизмов выживания арбовирусов в природе.

1.4.2.2 *In vitro* модели вируса клещевого энцефалита

Первичные клетки

Неврологические заболевания, вызванные флавивирусами, имеют тяжёлое течение и связаны с высоким уровнем смертности. Поэтому подробные механизмы репликации ВКЭ в головном мозге и особенности вирусного патогенеза требуют дополнительного изучения. Для таких исследований могут использоваться первичные культуры нейронов из гиппокампа, коры головного мозга или мозжечка мыши [263]. Для изучения патогенеза ВКЭ и механизмов проникновения через гематоэнцефалический барьер используют первичную культуру микрососудистых эндотелиальных клеток мозга человека (НВМЕС) [256]. Кроме того, была разработана первичная культура церебрального астроцита тупайи для изучения различного рода заболеваний центральной нервной системы [141]. Первичная культура клеток куриных эмбрионов (СЕС) может использоваться в качестве вспомогательного инструмента при характеристике природных очагов КЭ [261]. В то же время долго первичные клетки куриных эмбрионов служили основным субстратом для создания вакцин против КЭ [204].

Перевиваемые клеточные линии

Начиная с 1995 года, Всемирная организация здравоохранения рекомендует использовать в качестве субстрата не первичные клетки куриных эмбрионов, а перевиваемые клеточные линии, которые должны быть аттестованы в соответствии с международными требованиями к клеточным субстратам [230, 272]. Для получения многих вакцин в настоящее время используются перевиваемые клеточные линии обезьяньего происхождения [15], что обусловлено хорошей репликацией многих вирусов в этих клетках.

В частности ВКЭ хорошо реплицируется в перевиваемой линии клеток почки африканской зелёной мартышки (Vero) [156]. Было показано, что перевиваемые клеточные линии, в частности клетки Vero, позволяют оценить общий характер протекания флавивирусной инфекции [80], диагностический потенциал и антигенные свойства субвирусных частиц [110]. Клеточные линии сирийского хомячка ВНК-21 использовались в качестве удобного инструмента при разработках в области генной терапии против ВКЭ [162], при изоляции вируса из природных резервуаров или клинических образцов [167], а также при характеристике вирусных штаммов [164] и природных очагов КЭ [261]. Клеточные линии почки эмбриона человека НЕК 293Т и эпителиальных клеток шейки матки человека HeLa поддерживают репликацию вируса, но не оказывают цитопатического действия (ЦПД). HeLa является широко используемой перевиваемой клеточной линией, которая была инициирована в середине XX века из клеток, взятых из раковой опухоли шейки матки [94]. При помощи клеток НЕК 293Т и HeLa была изучена способность белка NS1 ВКЭ индуцировать окислительный стресс и активировать антиоксидантную защиту [191]. Кроме того, клетки НЕК 293Т применялись при изучении противовирусных механизмов [270]. При изучении способности разных штаммов ВКЭ индуцировать ИФН были использованы самые разнообразные клетки: обезьяньи клетки Vero B4 и Vero E6, эмбриональные клетки почки сирийского хомячка (ВНК-21), эмбриональные фибробласты мыши (MEF), а также человеческие клеточные линии – клетки НЕК 293Т и клетки карциномы лёгкого человека (A549) [255]. Человеческие клеточные линии НЕК 293Т, HeLa и клеточная культура глиобластомы человека (HGCC) были использованы также при изучении влияния разных флавивирусов на индукцию хемокинов клетки [257].

Клетки почки эмбриона свиньи СПЭВ (РЕК, PS) [213] наряду с клетками почки детёныша сирийского хомячка ВНК-21 и первичными клетками куриных эмбрионов СЕ являются общепринятой лабораторной моделью подавляющего большинства вирусологических исследований, которая активно используется в качестве вспомогательного инструмента при изучении патогенеза ВКЭ [256].

Кроме того, эта клеточная линия так же, как и линии клеток ВНК-21 и СЕ, была использована для изучения инфекционности вирусных стоков [99, 159]. Также данная клеточная линия хорошо подходит для разработки противовирусных средств [103, 231], оценки вариабельности геномов различных подтипов ВКЭ [267], изучения антигенной структуры вирусного белка [258], а также при исследовании адаптации ВКЭ к различным клеточным культурам [81].

*Клеточные линии на основе резервуарных хозяев
вируса клещевого энцефалита и других вирусов зоонозных инфекций*

В настоящий момент мировые и российские исследования протекания вирусных и бактериальных инфекций в организме природных резервуарных хозяев и переносчиков проводятся для широкого спектра патогенов и их хозяев, включая несколько видов клещей и комаров, летучих мышей, енотов, мышевидных грызунов, приматов и др. [124 и др.]. При этом многие авторы отмечают, что имеющиеся в настоящее время модельные системы *in vitro* не отражают ход естественной инфекции вирусов зоонозной природы. По этой причине в последние годы в качестве наиболее перспективного инструмента в исследованиях зоонозных вирусных инфекций рассматривается создание новых модельных систем на основе культур клеток естественных хозяев инфекций [86, 113, 124, 236 и др.]. Однако разнообразие, доступность и степень изученности таких моделей ещё очень невелики. Несмотря на большой интерес, вызванный изучением особенностей репродукции вируса на клеточном уровне, до сих пор не хватает моделей *in vitro*, которые отражают естественный ход инфекции и адаптацию большинства зоонозных вирусов, в частности флавивирусов, к их хозяевам. Для проведения подобных исследований требуется использование клеточных линий позвоночных резервуарных хозяев, охватывающих широкий спектр видов летучих мышей, насекомоядных и грызунов. В нашем исследовании преобладающим является сравнительный аспект особенностей инфекции ВКЭ в резервуарном и случайном хозяине, поэтому в следующих параграфах будут описаны существующие в настоящее время клеточные линии грызунов

и рукокрылых. Поскольку клещи являются беспозвоночными резервуарами ВКЭ, мы также посчитали уместным рассмотреть в этом обзоре существующие клещевые линии клеток.

Клеточные линии диких грызунов

Наиболее близкие варианты моделей на основе резервуарных хозяев – это недавно разработанные клеточные линии MRK101 красно-серой полёвки (*Myodes rufocanus bedfordiae*) и BVK168 рыжей полёвки (*Myodes glareolus*). Линия клеток MRK101 получена в Японии из почки полёвки – представителя семейства Хомякообразные отряда Грызуны, важных хозяев многих трансмиссивных инфекций, в том числе ВКЭ [166]. Тем не менее, данная линия клеток не тестирована на восприимчивость к ВКЭ и другим флавивирусам и рекомендована как инструмент для изучения хантавирусов *in vitro*. Линия BVK168 получена из почек полёвки в Германии [76]. Эта линия клеток позволяет культивировать ряд вирусов, ассоциированных с полёвками, однако она не была проверена на способность поддерживать репродукцию ВКЭ. Она рекомендована авторами для изучения *in vitro* биологии патогенов, ассоциированных с грызунами, в условиях, близких к естественным, а также для изоляции и исследования вирусов, тяжело поддающихся культивированию в традиционных культурах клеток. В Швеции были получены эмбриональные фибробласты полёвок (VEF) от зародышей *M. glareolus* [75] и показана восприимчивость к инфекции хантавируса Пуумала. Кроме того, в работе была продемонстрирована чувствительность VEF к другим вирусам, переносимым рыжими полёвками, таким как вирус коровьей оспы, вирус Люнгана, а также ВКЭ. Результаты исследования указывают на то, что VEF являются подходящей *in vitro* моделью для изучения нескольких зоонозных вирусов, ассоциированных с рыжими полёвками. В Корее были созданы клеточные линии из фибробластов полевой мыши (*Apodemus agrarius*) [121]. Первичные культуры клеток были спонтанно immortalizированы и охарактеризованы по морфологии и кариотипу. Авторами предполагалось, что эти клеточные линии будут полезны для оценки токсичных

веществ, которые угрожают биоразнообразию. Но поскольку грызуны рода *Apodemus* являются резервуарами многих зоонозных инфекций, в том числе ВКЭ, разработанная клеточная линия могла бы быть использована и для изучения особенностей вирусной репродукции.

Клеточные линии рукокрылых

Летучие мыши являются признанными резервуарами различных вирусных зоонозов [87, 134], в том числе и переносимых комарами флавивирусных инфекций [106, 219]. Также есть данные о выделении из рукокрылых флавивирусов, переносимых клещами [87, 209]. В экспериментах была продемонстрирована низкая пермиссивность клеток рукокрылых к комариным и клещевым флавивирусам [124, 149]. Тем не менее, наличие подобных работ указывает на то, что инфекция рукокрылых флавивирусами, в том числе и клещевыми [199], возможна, несмотря на отсутствие регулярного контакта летучих мышей и клещей в природе. Способность поддерживать репликацию/продукцию ВКЭ *in vitro* увеличивает возможность летучих мышей в качестве временного хозяина в жизненном цикле флавивирусов.

Существует небольшое количество клеточных линий рукокрылых. Как правило, это первичные и иммортализованные клеточные линии. В 2009 году австралийскими исследователями были успешно созданы и иммортализованы первичные культуры различных тканей чёрной летучей лисицы *Pteropus alecto* (как одного из наиболее широко распространённых видов рукокрылых в Австралии) для изоляции вирусов летучих мышей, а также в качестве инструментов, помогающих в изучении их иммунологии [122]. Клеточные линии этого вида были в дальнейшем использованы для изучения инфекции различных вирусов, в том числе и флавивирусов, передаваемых комарами [219]. В 2013 году в Индии была разработана клеточная линия эмбриональной ткани Цейлонского нетопыря (*Pipistrellus ceylonicus*), обозначаемая как NIV-BtEPC, и продемонстрирована её чувствительность к различным вирусам [124]. Для исследования взаимодействия хозяина и патогена в 2014 году в Чехии были

созданы первичные культуры клеток мозга (MmBr), миндалин (MmTo), брюшной полости (MmPca), носового эпителия (MmNep) и обонятельного нерва (MmNol) редкой летучей мыши *Myotis myotis*, или большой ночницы [126]. После иммортализации все пять клеточных линий поддерживали более чем 30 пассажей. В этом же году в Германии были получены первичные клеточные линии трахей летучих мышей *Carollia perspicillata* (очковый листонос) и *Eidolon helvum* (пальмовый крылан), отловленных в Гане (Африка), для изучения вирусов, переносимых летучими мышами [86]. Эти клетки были успешно культивированы как из свежих, так и из замороженных образцов органов и в дальнейшем были увековечены для создания иммортализованных клеточных линий. Через пару лет в США были созданы первичные клетки почки ямайских плодовых летучих мышей *Artibeus jamaicensis* для изучения взаимодействия рецептора дипептидилпептидазы 4 и MERS-CoV [214]. В работе было показано, что на рецепторном или клеточном уровне репликация MERS-CoV не ограничена. В 2017 году в Коста-Рике были созданы первичные эмбриональные клетки различных органов и тканей летучих мышей *Artibeus jamaicensis* (ямайский листонос), *Molossus sinaloae* (синалоаский складчатогуб) и *Desmodus rotundus* (обыкновенный вампир) для проверки способности клеток рукокрылых переносить инфекцию вируса Денге, комариного флавивируса [188]. В 2018 году для изучения коронавирусов ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) и тяжёлого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) в Гонконге были разработаны 12 различных первичных клеточных линий лёгких и почек летучих мышей семи разных видов, таких как *Hipposideros pomona*, *Miniopterus pusillus*, *Myotis ricketti*, *Pipistrellus abramus*, *Rhinolophus sinicus*, *Tylonycteris pachypus*, *Rousettus leschenaultii* [215]. Годом позже в Японии была создана первичная линия клеток бонинской летучей лисицы *Pteropus pselaphon*, охраняемого вида на севере и юге Иводзимы, в районах островов Бонин, и подробно изучены её свойства [125]. Эта клеточная линия установлена из повреждённых тканей 5-го пальца правой конечности рукокрылого, а также из кожи повреждённого крыла.

Перевиваемая клеточная линия почек летучей мыши *Eptesicus nilssonii* была также разработана коллективом из Японии и получила название HAMOI-EnK [120]. Клетки HAMOI-EnK обладают стабильными свойствами и могут пассироваться не менее 10 месяцев.

Клеточные линии клещей

Вирусные штаммы могут также культивироваться в клещевых клеточных линиях для изучения особенностей взаимодействия вируса и клеща на клеточном и молекулярном уровнях [150, 226, 237] и выявления различных транскриптов и белков, которые могут играть роль в противовирусных ответных реакциях клещей [170]. С тех пор, как были созданы первые линии иксодидных клещевых клеток [268], к настоящему моменту стало доступно более 40 клеточных линий клещей [246]. Как первичные культуры клещевых клеток, так и клеточные линии являются полезными системами для выделения и размножения клещевых патогенов. При изучении ВКЭ используются клещевые клеточные линии нимфы *Rhipicephalus appendiculatus* (RA257), эмбриональные клетки *Ixodes scapularis* (ISE6), эмбриональные клетки *Rhipicephalus appendiculatus* (RAE/CTVM1), спонтанно иммортализованная клеточная линия линяющей личинки *Amblyomma variegatum* (AVL/CTVM17), эмбриональные клетки *Ixodes ricinus* (IRE/CTVM18) [176, 225, 226, 237]. Кроме этого, в 1991 году сообщалось об установлении 5 перевиваемых клеточных линий из эмбриональных тканей клеща *Hyalomma anatolicum anatolicum* [90]. Несмотря на то, что этот вид клеща не является основным переносчиком ВКЭ, была продемонстрирована экспериментальная инфекция эмбриональных клеток *H. anatolicum anatolicum* (HAE/CTVM9) европейским субтипом ВКЭ [150]. Также в Эдинбургском университете в попытке получить перевиваемые клеточные линии *Dermacentor reticulatus* были созданы эмбриональные первичные культуры клеток [245]. По данным исследования 2011 года, проведённого коллективом авторов из Польши, заражённость клещей *D. reticulatus* ВКЭ составляет 10,8 % [206]. Поэтому первичные культуры клеток этого вида клещей в перспективе могут быть полезны

при изучении особенностей репродукции ВКЭ. Однако авторами данная культура клеток была рекомендована для выделения и изучения патогенных видов *Rickettsia* spp.

Системы культивирования *in vitro*, полученные из тканей клещей, играют неоценимую и незаменимую роль для изучения многих аспектов ВКЭ, а также самих клещей, включая базовую биологию паразитов, взаимоотношения «хозяин – переносчик – патоген» и борьбу с заболеваниями [246]. Однако следует подчеркнуть, что характеристика вирусной репродукции в клещевых линиях клеток будет неполной без использования клеточных линий млекопитающих – позвоночных резервуарных хозяев ВКЭ. Такие клеточные линии могут быть полезны для выявления общих биологических детерминант успешной инфекции вируса, обуславливающих его существование в природе.

Таким образом, системы культивирования *in vitro* являются важным дополнением к *in vivo* исследованиям заболеваний и их последствий, вызываемых ВКЭ. В настоящее время для изучения особенностей протекания естественной инфекции ВКЭ ввиду своей относительной простоты, доступности и технологичности ведущим подходом является подход *in vitro*.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Вирус

Для изучения репликации ВКЭ в клетках использовали изолят ВКЭ сибирского субтипа 92М [12], прошедший 4 пассажа в сосунках белых мышей и 6 пассажей в клетках СПЭВ. Для выращивания вируса в клетках использовались культуральные флаконы объёмом 175 см². Исходный препарат вируса приготавливали путём дополнительного препаративного пассажа в клетках СПЭВ с инкубацией в течение 2 суток. Стоковую вирусную суспензию собирали в центрифужные пробирки объёмом 15 мл, освобождали от дебриса центрифугированием при 6000 об./мин в течение 10 мин, аликвотировали и хранили при –80 °С. Концентрацию инфекционного вируса в стоковой суспензии определяли после однократного размораживания титрованием бляшкообразующих единиц (БОЕ) в культуре клеток СПЭВ [142] и выражали в виде десятичного логарифма БОЕ в миллилитре суспензии (lg БОЕ/мл).

2.1.2 Культуры клеток млекопитающих

Перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ приобретена в «Коллекции клеточных линий человека и животных для исследований в области вирусологии» (ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург).

В работе были использованы перевиваемые культуры клеток почки одной особи восточноазиатской лесной мыши (*Apodemus peninsulae*, самка) и одной особи сибирской ночницы (*Myotis sibiricus*, син. *M. brandtii brandtii*, самец). Мышевидных грызунов отлавливали в Ангарском районе Иркутской области с использованием живоловок Шермана во время сбора материалов

для мониторинга природных очагов клещевых инфекций [33]. Вид животных определяли на основе морфологических признаков, согласно стандартным определителям млекопитающих. Рукокрылых отлавливали энтомологическим сачком на месте зимовки в пещере «Охотничья» (Иркутская область, Иркутский район). Видовую принадлежность рукокрылых определяли по морфологическим признакам согласно [114].

Перевиваемая адгезивная линия клеток почки *A. peninsulae* ArnK была получена в лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск). В работе использовали сток клеток, прошедший 30 пассажей. Перевиваемая линия клеток почки *M. sibiricus* была установлена в ходе 20 серийных пассажей. Для обеих культур клеток был ранее проведён контроль контаминации посторонними микроорганизмами. В ПЦР не выявлено: ВКЭ, хантавирусов, морбилливирусов (в т. ч. вируса чумы плотоядных), вируса бешенства, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *B. miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Rickettsia* sp., *Mycoplasma* sp.

2.2 Методы

2.2.1 Культивирование клеток млекопитающих

Клетки СПЭВ поддерживали в культуральной среде RPMI 1640 (БиоЛот, Санкт-Петербург) с добавлением L-глутамина, антибиотиков (пенициллин + стрептомицин) и 5%-й эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, ThermoScientific, Великобритания). Клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере с 5% CO₂ и пересеивали, согласно паспорту, 1–2 раза в неделю.

Клетки ArnK и MdbK поддерживали в среде RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, антибиотиков (пенициллин + стрептомицин) и 10%-й ЭТС (HyClone, ThermoScientific, Великобритания). Культуры инкубировали при 37 °C в атмосфере с 5% CO₂. По мере формирования 100 % монослоя клетки открепляли

с помощью раствора трипсина-Версена (1:1) (БиоЛот, Санкт-Петербург) и пересевали с кратностью 1:5 в среднем 1 раз в 10 дней.

2.2.2 Подтверждение видовой идентичности культур клеток млекопитающих

Для подтверждения вида культуры клеток AprnK нарабатывали и анализировали фрагменты митохондриального гена цитохрома В (mtCytB, номер доступа GenBank KT983422) и последовательности D-петли митохондриального генома (d-loop, KT983423) с помощью ПЦР, согласно [165] и [137] соответственно. ДНК выделяли из 100 мкл клеточной суспензии в культуральной среде, содержащей $\sim 1 \times 10^5$ клеток, с помощью набора ДНК-сорб-В (Амплисенс, Москва), согласно инструкции производителя. Праймеры были любезно предоставлены д.б.н. Л. Н. Яшиной (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово), их структура и характеристика ампликонов приведены в Таблице 1.

Для подтверждения вида культуры клеток MdbK анализировали фрагмент митохондриального гена цитохромоксидазы 1. Подготовка пробы и выделение ДНК производились аналогично клеткам AprnK. Фрагмент амплифицировали в ПЦР с праймерами, разработанными в лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ. Структура праймеров приведена в Таблице 1, синтез праймеров выполнен с использованием коммерческого сервиса (ЗАО Евроген, Москва). Реакционная смесь была составлена на основе набора «Encyclo PCR» (ЗАО Евроген, Москва) в объеме 25 мкл. Условия амплификации включали предварительный прогрев смеси при 95 °С в течение 15 мин с последующими 45 циклами ПЦР: 95 °С в течение 20 с, 50 °С в течение 10 с, 72 °С в течение 2 мин.

Все полученные ПЦР-продукты очищали электрофорезом в 1%-м геле агарозы и секвенировали непосредственно по методу Сэнгера с помощью автоматического секвенатора с использованием коммерческого сервиса (Синтол, Москва).

Таблица 1 – Праймеры, использованные для верификации видовой принадлежности линий клеток млекопитающих

Обозначение	Последовательность	Вид, локус	Размер ампликона	Источник
L14724	5'-cgaagcttgatatgaaaaaccatcggtg-3'	<i>Apodemus</i> sp., CytB	~1200 bp	Irwin, 1991
H15915	5'-aactgcagtcacatctccggtttacaagac-3'			
CBT	5'- ccgccatcaacacccaaagctg-3'	<i>Apodemus</i> sp., d-loop	~450 bp	Morzunov, 1998
MR1	5'- ccctgaagtaagaaccagatgcctg-3'			
Mpet_COI_F57	5'-ccattttacctatgttcattaaccg-3'	<i>Myotis</i> sp., COI	~1500 bp	Эта работа
Mpet_COI_R1575	5'-tggtawggrrggaggacatcc-3'			

2.2.3 Оценка динамики репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток млекопитающих

Для изучения острой фазы инфекции заражение культур клеток производили с расчётной множественностью инфекции 10 БОЕ на клетку. Вирус адсорбировали при температуре 37 °С в течение 1 часа. После этого инокулят удаляли, клетки трижды промывали средой RPMI 1640 без добавления ЭТС и наслаивали сверху среду поддержки (RPMI 1640 с добавлением антибиотиков и 2%-й ЭТС). Отбор образцов для оценки инфекционности, продукции антигена ВКЭ и внутриклеточной концентрации РНК ВКЭ положительной полярности (+РНК) производили сразу после нанесения среды поддержки (0 ч после заражения), а также через 4, 8, 10, 12, 14, 16, 20 и 24 ч, а также на 2-й, 3-й, 4-й и 5-й дни после заражения. Отбор был произведён также и на 16-й день инфекции. При отборе образцов клеток для выделения РНК среду поддержки удаляли, монослой клеток промывали стерильным фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH = 7,4), отделяли от дна лунки, ресуспендировали в 100 мкл ФСБ и подсчитывали количество клеток в камере Горяева. Эксперимент проведён в трёх независимых повторях.

Для изучения персистентной инфекции клетки выращивали в 25 см² культуральных флаконах и заражали с расчётной множественностью 0,1 БОЕ на клетку. Вирус адсорбировали при температуре 37 °С в течение 1 часа. После этого инокулят удаляли, клетки трижды промывали средой RPMI 1640 без добавления ЭТС и наслаивали сверху среду поддержки (RPMI 1640 с добавлением антибиотиков и 2%-й ЭТС). Еженедельно монослой клеток открепляли с помощью трипсина с добавлением 0,5 мМ этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) и пассировали в соотношении 1:2. Всего было проведено 25 пассажей. Образцы собирали ежемесячно. При отборе образцов клетки аккуратно отделяли от среды поддержки, ресуспендировали в 100 мкл ФСБ и подсчитывали количество клеток в камере Горяева. Эксперимент проведён в четырёх независимых повторях.

Образцы культуральной среды в обоих экспериментах осветляли центрифугированием при 13400 об./мин в течение 5 мин, аликвотировали и хранили при -80°C до титрования БОЕ и определения антигена ВКЭ. Выделение РНК производили немедленно после сбора из равных для обеих культур количеств клеток. Очищенную РНК до исследования хранили в изопропанолe при -80°C .

2.2.4 Титрование вируса клещевого энцефалита по бляшкообразующим единицам и морфология бляшек

Серийные десятикратные разведения суспензии ВКЭ в RPMI 1640 без добавления ЭТС наносили на монослой клеток СПЭВ в соответствующие лунки 24-луночной планшеты. Объем инокулята составлял 250 мкл. После 1 ч адсорбции при 37°C инокуляты удаляли, а клетки заливали средой поддержки (RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, антибиотиков, 2%-й ЭТС и 1%-й агарозы (SeaPlaque, Cambrex, США)). Планшеты остужали до комнатной температуры в течение 30 мин и инкубировали в течение 5 дней при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . По окончании инкубации клетки фиксировали 4%-м формальдегидом, промывали водой и окрашивали 0,05%-м раствором кристаллического фиолетового в дистиллированной воде.

2.2.5 Оценка цитопатического действия вируса клещевого энцефалита

Полностью сформированные монослои клеток в 24-луночных планшетах инфицировали соответствующим штаммом ВКЭ с множественностью инфекции 1 БОЕ на клетку (МИ = 1). После 1 ч адсорбции при 37°C инокуляты удаляли, а клетки заливали средой поддержки (RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, антибиотиков, 2%-й ЭТС) и инкубировали в течение 5 дней при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . По окончании инкубации клетки фиксировали 4%-м формальдегидом, промывали водой и окрашивали 0,05%-м раствором кристаллического фиолетового. Окрашенные клетки промывали водой, тщательно удаляли избыток

влаги и высушивали на воздухе при комнатной температуре. После этого производили визуальную оценку цитопатического действия. Для оценки количества жизнеспособных клеток каждую лунку экстрагировали метанолом и измеряли оптическую плотность экстрактов при длине волны 590 нм. Долю выживших клеток рассчитывали как отношение оптической плотности экстрактов инфицированных монослоёв к оптической плотности лунок с незаражёнными клетками и выражали в процентах. На каждой экспериментальной планшете были предусмотрены 4 независимые лунки отрицательного контроля (незаражённые клетки). Каждый тест также проводился в 4 независимых повторях, на основе которых рассчитывали средние значения и 95%-й доверительный интервал.

2.2.6 Выделение РНК, реакция обратной транскрипции, полимеразная цепная реакция

Суммарную РНК выделяли из 100 мкл культуральной среды или из 100 мкл суспензии клеток млекопитающих после заражения. Выделение производили с помощью набора Рибо-Преп (Амплисенс, Москва), согласно инструкции производителя. Культуральную жидкость перед выделением РНК осветляли центрифугированием при 10–14 тыс. об./мин. Для клеточных суспензий определяли концентрацию живых клеток с помощью камеры Горяева и окрашивания трипановым синим. Осадок РНК растворяли в 50 мкл деионизированной стерильной воды, и 10 мкл раствора РНК использовали для проведения обратной транскрипции (ОТ). Для устранения возможности контаминации на этапах выделения РНК и ОТ-ПЦР не использовали положительные контроли. Также положительные контрольные образцы не использовали при ПЦР-амплификации фрагментов для секвенирования. Отрицательные контрольные реакции проводились на всех этапах анализа.

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора для обратной транскрипции Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве праймера для обратной транскрипции с матрицы +РНК использовали

антисмысловой праймер 11154R 5'-AGCGGGTGT TTTTCCG-3'. Для контроля специфичности амплификации цепей РНК были использованы смысловой праймер к –РНК 10072F 5'-GCTTGGATGACCACAGAGGAC-3', случайные гексануклеотиды и непраймированная ОТ-смесь. Количественную ПЦР проводили согласно методике M. Schwaiger и P. Cassinotti с модификациями [224]. Реакционная смесь в объёме 25 мкл содержала 1 ед. полимеразы HSTaq (Евроген, Москва), 2,5 мкл оптимизированного реакционного буфера (Евроген, Москва), 0,25 mM каждого dNTP, праймеры F-TBE1 5'-GGGCGGTTCTTGTCTCC-3' и R-TBE1 5'-ACACATCACCTCCTTGTCAGACT-3' в концентрациях 50 nM и 300 nM соответственно, а также зонд TBE-Probe-WT 5'-(FAM)TGAGCCACCATCACCCAGACACA(RTQ1)-3' в концентрации 200 nM (Синтол, Москва). Режим ПЦР включал предварительный прогрев при 95 °C в течение 10 мин с последующими 45 циклами: 95 °C в течение 15 с, 60 °C в течение 1 мин. Регистрацию результатов проводили по каналу FAM на стадии 60 °C. Циклом количественного определения (quantification cycle, Cq) считали первый цикл, при котором интенсивность флуоресцентного сигнала превышала 10 стандартных отклонений от фона. Фоновая составляющая учитывалась с 1-го по 10-й цикл. Расчёты выполняли с помощью программы BioRad CFX Manager v. 3.1 (Bio-Rad Laboratories Inc., США). В каждую постановку был включён отрицательный контроль, содержащий все компоненты реакции ОТ-ПЦР, за исключением матричной РНК. Реакция проводилась в амплификаторе C1000 Touch с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories Inc., США).

2.2.7 Секвенирование

Секвенирование полногеномной последовательности изолята 92М проводили по методу Сэнгера с помощью автоматического анализатора с использованием коммерческого сервиса (Синтол, Москва). Для этого получали набор перекрывающихся ампликонов, которые секвенировали с помощью фланкирующих и внутренних праймеров. Полимеразную цепную реакцию

проводили в объёме 25 мкл с использованием ДияТaq ДНК полимеразы (Амплисенс, Москва) и необходимых праймеров. После завершения ПЦР продукты анализировали в агарозном геле, целевые фрагменты очищали с помощью пассивной элюции из геля с последующим центрифугированием и использовали для прямого секвенирования. Список праймеров приведён в Таблице 2.

Редактирование ридов, составление контигов и извлечение консенсусной последовательности выполняли вручную с помощью программы BioEdit 7.0.5.3 [152].

Секвенирование образцов после персистентной инфекции производили на базе ЦКП «ПЦР-диагностика» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск) с помощью высокопроизводительного секвенатора NextSeq 550 (Illumina, США). Чтобы исключить из анализа ошибки полимераз в процессе пробоподготовки, формирования библиотек и секвенирующей реакции, для каждого образца подготавливали две независимых пробы двухцепочечной ДНК. В анализе учитывали только те мутации, которые были представлены в обеих пробах. РНК выделяли из 100 мкл культуральной жидкости после 25 пассажей клеток. Первую цепь комплементарной ДНК получали с помощью обратной транскриптазы Superscript III (Invitrogen) и специфичного праймера 11154_r (Таблица 2), вторую цепь синтезировали с помощью высокоточной ДНК полимеразы и праймеров TBE-5'longf и 11154_r (Таблица 2) в ходе 5 циклов ПЦР: 95 °C в течение 1 мин, 50 °C в течение 10 с, 72 °C в течение 10 мин. Приготовление библиотек выполняли с помощью набора Nextera XT и совместимых индексов IDT® for Illumina Nextera DNA UD Indexes Set A (Illumina). Секвенирование проводили в режиме 2 × 150 с использованием комплекта реагентов 1 x NextSeq 500/550 High Output Kit v. 2.5 (300 Cycles). Обработку ридов проводили с помощью облачного сервиса BaseSpace Sequence Hub (Illumina, <https://basespace.illumina.com/dashboard>) с использованием программ FastQ и FastQC, Картирование ридов на геном ВКЭ и извлечение консенсусных последовательностей производили с помощью инструмента Burrows – Wheeler Alignment-MEM [180]. В качестве индексного генома использовали полногеномную последовательность изолята 92М. Анализ выполняли с использованием веб-платформы Galaxy [242].

Таблица 2 – Праймеры, использованные для секвенирования генома изолята 92М

Название	Последовательность, 3'-5'	Использование	Tm (°C)
3'42	agcgggtgttttccgagtcacwcatcacctcctgtcagac	ПЦР	68–74
tbe3`consr	agcgggtgttttccgagt	секвенирование	56,7
tbe5`consf	ccagattttcttgcrctg	секвенирование	53,5
tbe5`longf	agattttcttgcrctgcrtgcgtttgcttcgg	ПЦР	67
tbe-5293-f	gtggtrctyaargaaatgga	ПЦР, секвенирование	51,1
tbe-5872-r	acctcytcvgyttagtgtttgt	ПЦР, секвенирование	57,6
tbe3`-13r	aaggaggtgatgwtgactcggaacacccg	ПЦР	65,5
5230-r	ggaggactctgtgggtcttcc	ПЦР, секвенирование	58,8
5230-r-rt	ctctgtgggtcttcc	ОТ	47,9
1f	agattttcttgcrctgc	ПЦР, секвенирование	52,6
565f	cacctgtgtgathctggc	секвенирование	54
1089f	ytcratggaygtgtggcttga	секвенирование	56,7
1624f	gactggtyaatgatctggc	секвенирование	52,4
2212f	acagtgatmggrgarcacgcctg	секвенирование	61,5
2817f	ggccantcartgatctggag	секвенирование	55,3
3342f	grggrgcwtctgtgaggag	ПЦР, секвенирование	56,8
3817f	ctcacygtcmgagagatggt	секвенирование	55,4
4357f	gtkgygaatggagtggctg	секвенирование	58,8
4864f	gaggaraartggaaaggtga	секвенирование	52
5293f	gtggtrctyaargaaatgga	секвенирование	51,1
5872f	gtgagccgygtyatagatgg	секвенирование	55,3
6408f	gttyaragarggacgtgacatca	ПЦР, секвенирование	55,3
6937_f	aaggcrgayytgtccac	ПЦР, секвенирование	53,1
w_6888_f	ccttgctggactggttcag	секвенирование	58,8
s_6877_f	actctctgcagtctggctgg	секвенирование	58,6
fe_6931_f	agacyaaggcggacctgtc	секвенирование	57,4
7627_f	gggcaymgrctctggct	секвенирование	58,3
fe_7427_f	cctggctcttrgcgatagtc	секвенирование	56,4

Продолжение таблицы 2

Название	Последовательность, 3'-5'	Использование	Tm (°C)
s_7469_f	tgaacagaacggtggcttcc	секвенирование	57,5
8305_f	aggaaytcmacccatgaratgta	секвенирование	54,4
8908_f	gatgagcaraacagrtgg	ПЦР, секвенирование	50,7
9502_f	acccthacyaacataaaggt	ПЦР, секвенирование	50,1
10124_f	tggacaayccyttcatgca	ПЦР, секвенирование	54
11154_r	agcgggtgttttccg	ПЦР, секвенирование	52,8
10142_r	tgcatgaarggrttgtcca	секвенирование	54
9521_r	acctttatgttrgtdagggt	секвенирование	50
8925_r	ccayctgttytgctcatc	ПЦР, секвенирование	50,7
8327_r	tacatytcatgggtkgarttcct	секвенирование	54,4
7643_r	agccagagyckrtgccc	секвенирование	58,3
6953_r	gtggacarrtcygcctt	ПЦР, секвенирование	53
6430_r	tgatgtcacgtccytctytraac	секвенирование	55,4
5891_r	ccatctatracrggctcac	ПЦР, секвенирование	55,2
5312r	tccatttcytragyaccac	секвенирование	51,1
4883r	tcaccttccaytтыtcctc	секвенирование	52
4376r	cagccactccattcrgcmac	секвенирование	58,8
3836r	accatctctckgacrgtgag	ПЦР, секвенирование	55,4
3470r	cgtatttccatggcatacca	секвенирование	52,4
3362r	ctctcacagawgcyccyckt	секвенирование	59,1
2837r	ctccagatcaytgantggccc	секвенирование	57,6
2234r	caggcgtgytcyckatcactgt	секвенирование	61,5
1643r	gccagatcattraaccagtc	секвенирование	52,3
1083r	cacacrtccatygarggcttc	секвенирование	57,1
584r	gccagdatcacacaggtgcc	секвенирование	59,4

Для сравнительного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали программу MegaX [185].

2.2.8 Приготовление стандартных образцов концентрации РНК для количественной полимеразной цепной реакции

Конструирование матрицы для in vitro транскрипции

Для амплификации целевого фрагмента вирусного генома использовали изолят ВКЭ 92М [12]. Вирус поддерживали в культуре клеток СПЭВ. Суммарную РНК выделяли из надклеточной жидкости с помощью наборов «РибоПреп» (Амплисенс, Москва). Обратную транскрипцию проводили с использованием комплекта «Реверта-L» (Амплисенс, Москва). Консервативную часть 3'-конца генома амплифицировали в ПЦР с помощью праймеров 10072F (5'-GCTTGGATGACCACAGAGGAC-3') и 11154R (5'-AGCGGGTGTTTTTCCG-3'). Полученный ампликон длиной 853 н.о. лигировали в плазмидный вектор pTZ57R-T/A (Fermentas, Литва) и клонировали в компетентных клетках *E. coli* DH5alpha по протоколу [102]. Селекцию корректных клонов производили с помощью ПЦР-скрининга с фланкирующими ПЦР-праймерами 10072F и 11154R. Итоговая конструкция содержала целевой фрагмент клонированный в направлении $5' \rightarrow 3' + 1G$ под промотором РНК полимеразы Т7, что позволяет синтезировать *in vitro* смысловую цепь РНК (+РНК) ВКЭ (Рисунок 1). Клон pTZ57R_TBEV-92M_10072-11154 с корректной вставкой наращивали в 100 мл жидкой среды *Luria – Bertani* с добавлением ампициллина в течение ночи. Плазмидную ДНК очищали с помощью набора AxyPrep Plasmis Miniprep Kit (Axygen, США), согласно инструкции производителя, и растворяли в 150 мкл стерильной бидистиллированной воды. Плазмиду линеаризовали эндонуклеазой PstI (Сибэнзим, Новосибирск) при 37 °С в течение 1 ч.

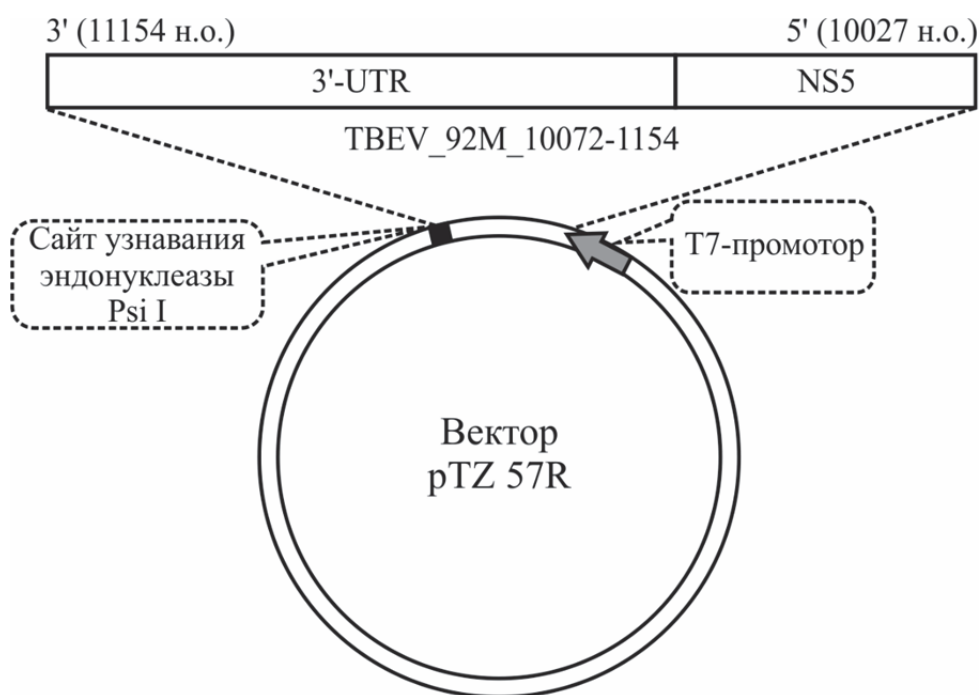


Рисунок 1 – Консервативная область участка комплементарной ДНК ВКЭ, встроенная в плазмидный вектор pTZ 57R под промотором T7 РНК полимеразы

Эффективность лизиса оценивали электрофоретически. Линейную конструкцию использовали в качестве матрицы в транскрипции РНК *in vitro*.

Транскрипция РНК in vitro и очистка синтетической РНК

Реакционная смесь в объёме 50 мкл содержала 200 U T7 РНК-полимеразы (Сибэнзим, Новосибирск), 1 mM рНТФ (ДНК-синтез, Москва) и 80 U ингибитора РНКаз «RNasin» (Promega, США), 5 мкл 10X T7 буфера и свободную от рибонуклеаз воду до выполнения объёма. Количество линейаризованной матрицы pTZ57R_TBEV-92M_10072-11154 варьировали в процессе оптимизации условий реакции от 0,1 до 1 мкг. Для удаления матричной ДНК реакционную смесь после T7-транскрипции обрабатывали свободной от РНКаз ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, США). После окончания инкубации для инактивации фермента использовали по 10 мкл 50 mM ЭДТА на каждый образец с последующей инкубацией при 65 °C в течение 10 мин. Полученную РНК очищали от реакционной смеси с помощью наборов «РибоПреп» (Амплисенс, Москва) и растворяли в 50 мкл буфера для разведения РНК.

Приготовление панели стандартных образцов

Концентрацию синтезированной РНК в стоковом растворе оценивали спектрофотометрически с помощью прибора NanoVue Plus (Biochrom, США). Количество копий РНК в одном микролитре раствора рассчитывали на основе известной нуклеотидной последовательности синтезированного фрагмента с помощью онлайн-калькулятора ENDMEMO (<http://endmemo.com/bio/dnascorunum.php>). Для приготовления стандартов концентрации РНК стоковый образец разбавляли до расчётной концентрации 10^9 копий РНК/мкл и приготавливали серийные десятикратные разведения синтетической РНК в диапазоне от 10 до 10^9 копий РНК/мкл.

2.2.9 Определение антигена вируса клещевого энцефалита

Антиген ВКЭ выявляли в 100 мкл культуральной жидкости с помощью иммуноферментного анализа с использованием тест-системы «ИФА ТС АГ ВКЭ» (ФГУП «НПО «Микроген», Томск). Измерение оптической плотности производили при длине волны 450 нм с помощью планшетного спектрофотометра Immunochem 2100 (США). Аналитическим пределом детекции антигена считали пороговый уровень оптической плотности ($ОП_{пор.}$) который устанавливали, в соответствии с инструкциями производителя тест-систем, следующим образом:

1. Вычислить среднее арифметическое значение ОП отрицательных контрольных образцов ($ОП_{отр.}$).

2. В случае если $ОП_{отр.} > 0,045$, $ОП_{пор.} = ОП_{отр.} \times 2,1$.

3. В случае если $ОП_{отр.} < 0,045$, $ОП_{пор.} = ОП_{отр.} + 0,05$.

Значения ОП выше порогового уровня считали специфическими и прямо пропорциональными концентрации антигена ВКЭ в исследуемом материале.

2.2.10 Представление результатов корреляционного анализа стадий репродукции вируса клещевого энцефалита в разных клеточных линиях

В нашей работе под стадиями репродукции ВКЭ подразумеваются три ряда данных: динамика репликации РНК ВКЭ (на основе данных количественной ПЦР); динамика трансляции вирусного полипротеина (на основе определения белка Е с помощью иммуноферментного анализа); динамика репродукции инфекционного ВКЭ (на основе титрования БОЕ). Корреляционный анализ репродуктивных стадий вируса в линиях клеток СПЭВ, AprnK и MdbK проводили попарно между этими показателями для каждой клеточной линии. Анализ был проведён как для острой (МИ = 10), так и для персистентной (МИ = 0,1) инфекции. При этом для более корректного сравнения результатов острой инфекции время наблюдения было условно поделено на ранний (0–24 часа после заражения) и поздний (2–16 суток) этапы инфекции. Данные, полученные на этих этапах, анализировались отдельно. Таким образом, для каждой клеточной линии были проанализированы три стадии репродукции в трёх временных интервалах.

Относительную согласованность стадий репродукции для каждой линии клеток оценивали по балльной системе. Баллы присваивали исходя из значений коэффициента корреляции r (см. подраздел 2.2.11), а именно: при высокой степени статистической значимости ($p < 0,05$) количество баллов соответствовало значению r ; при низкой степени статистической значимости ($p > 0,05$) коэффициент r оценивался в 0 баллов. Степень сбалансированности стадий жизненного цикла вируса оценивали путём сложения баллов раннего и позднего этапов острой инфекции, а также баллов персистентной инфекции для соотношений РНК/инфекционный ВКЭ, РНК/полипротеин и полипротеин/инфекционный ВКЭ. Полученную сумму расценивали как «индекс репродуктивного баланса» ВКЭ и использовали для сравнения репродукции вируса в клеточных линиях СПЭВ, AprnK или MdbK.

2.2.11 Статистическая обработка данных

Если это не обозначено отдельно, результаты представлены в виде средних значений трёх независимых воспроизведений эксперимента. Эффективность ПЦР выражали в процентах и рассчитывали по формуле:

$$(10^{[-1/k]} - 1) \times 100, (1)$$

где k – угловой коэффициент (slope) стандартной кривой.

Соответствие определения концентрации ДНК линейной модели оценивали по коэффициенту детерминации R^2 , реакцию считали линейной при $R^2 > 0,98$. Для оценки точности измерения количества ДНК вычисляли коэффициент вариации CV (%) средних значений стандартной кривой после пяти независимых воспроизведений в ходе 5 тестов в разные дни (межтестовая точность). Для оценки вариабельности наблюдений рассчитывали стандартное отклонение средних значений. Выпадающие значения концентрации РНК исключали с помощью квартильного метода [207]. Оценку статистической значимости межгрупповых различий производили с помощью t -критерия Стьюдента, а также с помощью критерия Манна – Уитни; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Корреляционный анализ выполняли с помощью критерия ранговой корреляции r -Спирмена. Расчёты производили с помощью программы MS Office Excel 2003 (Microsoft Corp., США) и пакета статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, США).

ГЛАВА 3 ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА СПОСОБЕН РЕПРОДУЦИРОВАТЬСЯ В ЛИНИЯХ КЛЕТОК РЕЗЕРВУАРНОГО И СЛУЧАЙНОГО ХОЗЯЕВ ПРИ ВЫСОКОЙ МНОЖЕСТВЕННОСТИ ЗАРАЖЕНИЯ

3.1 Формирование стоков культур клеток и верификация видовой принадлежности

Для создания клеточных моделей с однородными культуральными свойствами каждую из используемых клеточных линий ApnK, MdbK и СПЭВ пересеивали и наращивали в четырёх культуральных флаконах площадью 175 см² до плотности монослоя, визуальной оцениваемой в 90–100 %. Сразу по достижении требуемой плотности клетки открепляли от подложки (см. Глава 2), подсчитывали общее количество клеток в стоке, отбирали аликвоту $\sim 10^5$ клеток для верификации видовой принадлежности и концентрировали центрифугированием. Осадок клеток ресуспендировали в 16 мл среды для заморозки, замораживали при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ с декрементом температуры $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту и аликвотировали по 1 мл. Аликвоты хранили в жидком азоте в качестве рабочего стока. Общее количество клеток в рабочем стоке каждой культуры составляло порядка 1×10^8 клеток.

Для верификации вида клеток были определены и проанализированы фрагменты митохондриальных локусов CytB и d-loop для ApnK и COI для MdbK. Номера доступа нуклеотидных последовательностей приведены в Таблице 3.

Таблица 3 – Последовательности фрагментов генома культур клеток, использованные для верификации видовой принадлежности

Культура клеток	Ген/локус	Продукт	Длина фрагмента, н.о.	Номер доступа в GenBank
ApnK	CytB	Митохондриальный цитохром В	632	КТ983422.1
	d-loop	–	431	КТ983423.1
MdbK	COI	Митохондриальная цитохромоксидаза, субединица 1	687	MT984208

Идентификация таксономической принадлежности производилась с помощью поиска наиболее гомологичных последовательностей с использованием инструмента BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Результаты идентификации приведены в Таблице 4. Наиболее близкородственными последовательностями оказались:

- 1) для ApnK-CytB – AB073806, *Apodemus peninsulae* изолят GC2-98 [79];
- 2) для ApnK-d-loop – AY588251, *Apodemus peninsulae*, ваучер образца «77»;
- 3) для MdbK-COI – JF442893, *Myotis brandtii brandtii* (син. *Myotis sibiricus*), ваучер образца «ZMMU S-171627».

Таблица 4 – Идентификация видовой принадлежности клеточных линий ApnK и MdbK

Линия клеток, локус	Видовая принадлежность	GenBank ID	Покрытие элайнмента	Идентичность последовательности
ApnK, CytB	<i>Apodemus peninsulae</i>	AB073806	100 %	99,84 %
ApnK, d-loop	<i>A. peninsulae</i>	AY588251	100 %	98,14 %
MdbK, COI	<i>Myotis brandtii brandtii</i> (heterotypic synonym <i>Myotis sibiricus</i>)	JF442893	95 %	100 %

Примечание: * – номер наиболее схожей последовательности в GenBank

Таким образом, используемые клеточные линии ArnK и MdbK принадлежат видам *Apodemus peninsulae* и *Myotis sibiricus* соответственно.

3.2 Оценка цитопатического действия вируса клещевого энцефалита в клеточных линиях СПЭВ, ArnK и MdbK

При заражении с множественностью инфекции 1 БОЕ/клетку в культуре клеток СПЭВ первые проявления цитопатического действия вируса регистрировались на вторые сутки после заражения с множественностью инфекции. Это проявлялось в грануляции цитоплазмы и округлении формы некоторых из прикреплённых клеток и небольшом увеличении количества плавающих клеток и дебриса. На третьи сутки после заражения ЦПД проявлялось в статистически значимом снижении жизнеспособных клеток, разрежении монослоя и появлении значительного количества дебриса. Через неделю после заражения патологические процессы усугублялись, монослой разрушался приблизительно на 2/3 (Рисунок 2), а многие клетки имели неправильную форму с сильно гранулированной цитоплазмой.

В культуре клеток ArnK небольшие проявления ЦПД вируса появлялись на 5–7-й день после заражения в виде изменения морфологии клеток и разрежения монослоя, однако к 7-му дню инфекции выживало порядка 80 % клеток (Рисунок 2), а далее наблюдался медленный восстановительный рост монослоя (не показано).

В культуре клеток MdbK проявлений ЦПД не было заметно ни на ранних, ни на поздних сроках инфекции. Хотя на третий день инфекции отмечалось некоторое снижение количества жизнеспособных клеток (80–90 %), через неделю после заражения монослой полностью восстанавливался и даже отмечалась тенденция к увеличению количества жизнеспособных клеток в заражённых культурах по сравнению с контрольными (Рисунок 2).

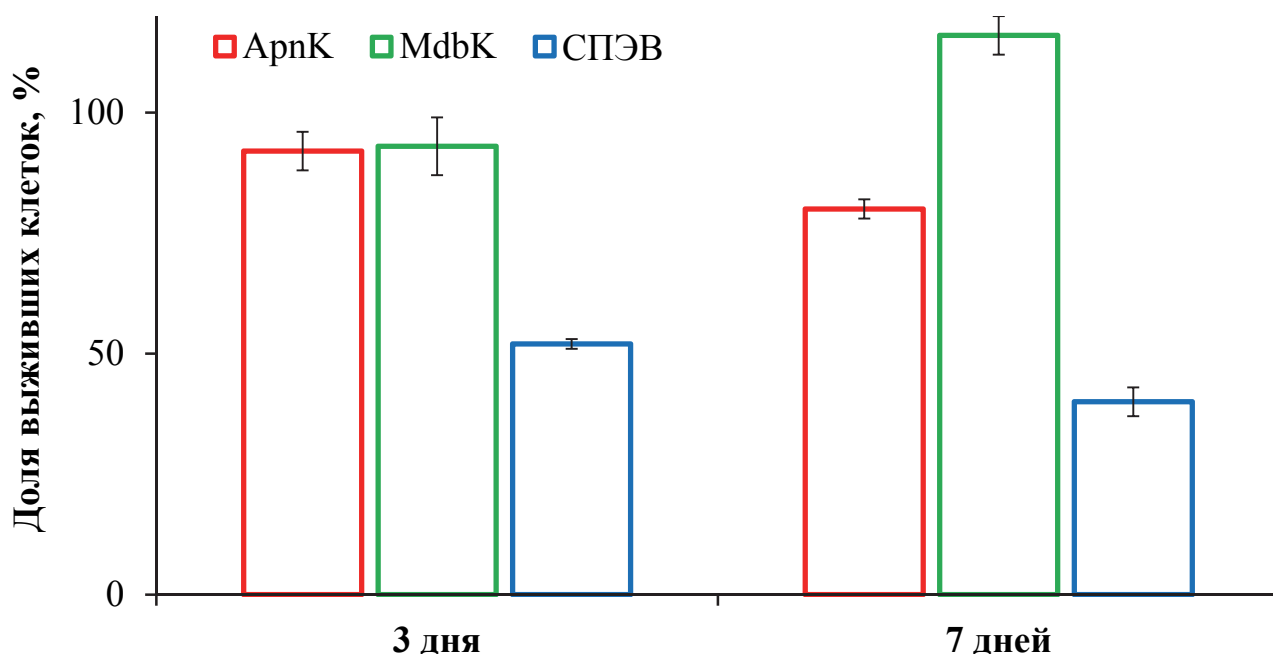


Рисунок 2 – Цитопатическое действие ВКЭ на культуры клеток *A. peninsulae* (ApnK), *M. sibiricus* (MdbK) и почек эмбриона свиньи (СПЭВ). Оценку количества жизнеспособных клеток проводили с помощью окрашивания фиксированного монослоя кристаллическим фиолетовым с последующей экстракцией и спектрофотометрическим измерением оптической плотности (ОП) экстрактов. Долю выживших клеток рассчитывали в процентах как отношение ОП экстрактов заражённых клеток к ОП незаражённых культур того же вида. Эксперимент воспроизводили в 4 независимых повторах. Планки погрешностей отражают 95 % доверительный интервал

Таким образом, культура клеток случайного хозяина MdbK является наименее чувствительной к заражению ВКЭ, цитопатическое действие вируса не выражено, гибели клеток вследствие заражения ВКЭ не происходит. Культура клеток резервуарного хозяина проявляет выраженный цитопатический ответ на вирусную инфекцию, однако отличается высоким уровнем выживаемости клеток. Культура клеток СПЭВ наиболее чувствительна к заражению ВКЭ, развивает генерализованную цитопатическую реакцию и отличается массовой гибелью заражённых клеток.

3.3 Сравнение динамики репликации вирусной РНК в исследуемых клеточных линиях при высокой множественности инфекции

В клетках СПЭВ статистически значимое нарастание концентрации внутриклеточной +РНК ВКЭ отмечено через 8 ч после заражения ($p = 0,0495$), далее наблюдалось плавное повышение до 16 ч, после чего концентрация внутриклеточной РНК стабилизировалась на уровне 8 lg копий/мкл (Рисунок 3) и удерживалась на этом значении в течение первых суток инфекции. К исходу вторых суток инфекции концентрация +РНК внутри клеток СПЭВ продолжала нарастать и достигала пиковых значений 9,5 lg копий/мкл. После этого начиналось плавное снижение концентрации, и на 5–16-й день после заражения концентрация +РНК в клетках СПЭВ стабилизировалась на уровне ~7,3 lg копий/мкл. В целом можно отметить, что в течение первых 5 суток репродукции в клетках СПЭВ происходило три ступенчатых повышения концентрации +РНК ВКЭ, а именно с 4 до 8 ч, с 12 до 16 ч и с 24 до 48 ч после заражения.

В клетках восточноазиатской лесной мыши синтез +РНК ВКЭ происходил с существенной задержкой по сравнению с культурой СПЭВ – статистически значимое повышение концентрации до 5,3 lg копий/мкл отмечено только через 10 ч после заражения ($p = 0,0455$) (Рисунок 3). Через 24 часа концентрация была ниже, чем в СПЭВ – 6,8 против 8,0 lg копий/мкл, хотя статистическая поддержка наблюдаемых различий была низкой ($p = 0,13$). Далее концентрация +РНК в АрпК продолжала нарастать и через 3 дня после заражения статистически значимо не отличалась от таковой в клетках СПЭВ (9,13 и 9,07 lg копий/мкл соответственно; $p = 0,8$). На этом уровне концентрация +РНК оставалась стабильной до 5 дней после заражения, после чего начинала плавно снижаться, достигая минимального значения 7,8 lg копий/мкл. В отличие от клеток СПЭВ, в АрпК отмечено только два ступенчатых нарастания концентрации +РНК – с 8 до 10 ч и с 24 до 48 ч после заражения. При этом на поздних сроках инфекции

концентрация +РНК ВКЭ в этой культуре более стабильна, чем в клетках СПЭВ (9,2 против 7,4 lg копий/мкл соответственно; $p = 0,0495$).

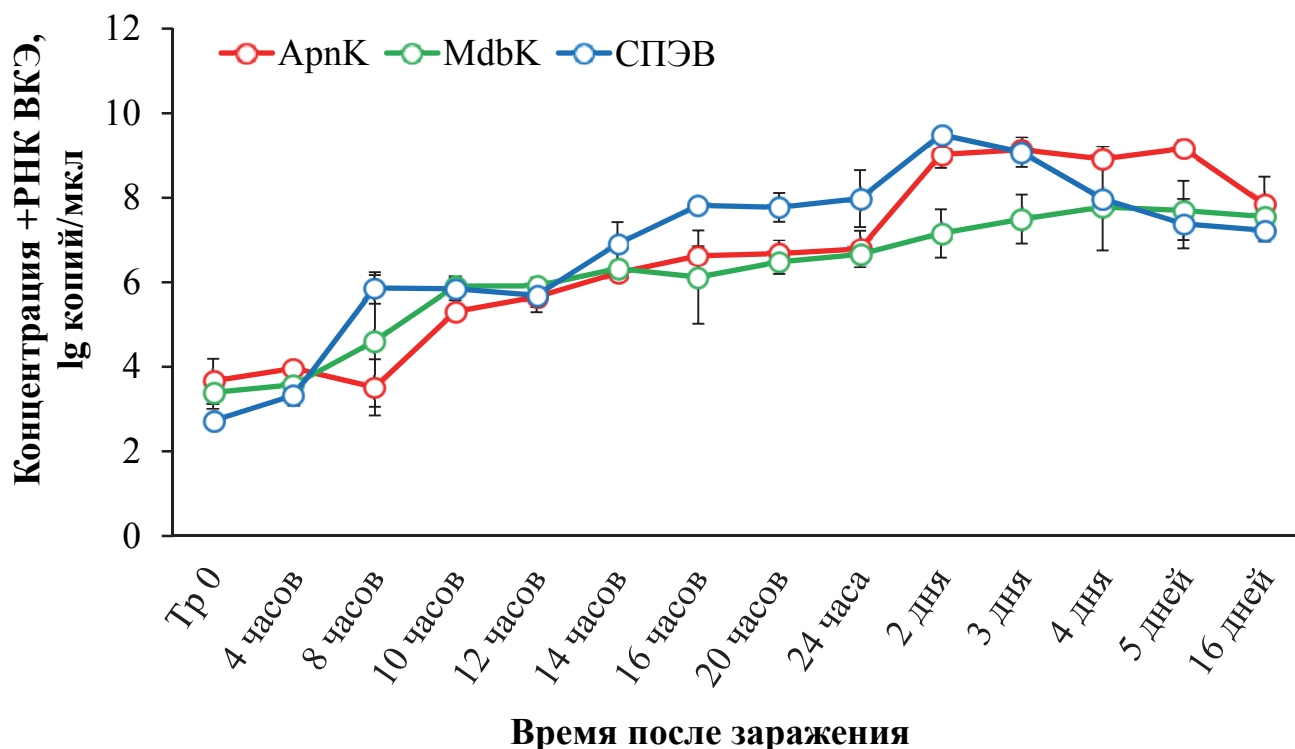


Рисунок 3 – Динамика накопления +РНК ВКЭ в линиях клеток млекопитающих при острой инфекции (МИ = 10). По оси абсцисс – время сбора клеток после заражения для выделения вирусной РНК (в 1-е сутки сбор производился через 2–4 часа, далее ежедневно по 5-е сутки, а также на 16-й день после заражения). По оси ординат – концентрация +РНК ВКЭ в клеточных линиях (lg копий/мкл). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение по результатам трёх независимых повторов

В клетках случайного хозяина MdbK через 10 ч после заражения наблюдалось статистически значимое ($p = 0,0455$) повышение концентрации +РНК до 5,9 lg копий/мкл (Рисунок 3). В течение первых 24 ч концентрация плавно повышалась до 6,6 lg копий/мкл, что сопоставимо с концентрацией в клетках ApnK ($p = 0,8$). Однако далее репликация +РНК в MdbK замедлялась и к исходу третьих суток достигала значений 7,5 lg копий/мкл, при этом различия с культурами СПЭВ и ApnK были статистически значимы ($p = 0,0495$). Изменения концентрации +РНК

в культуре клеток *M. sibiricus* были линейны и не проявляли ступенчатого характера, выражаясь в плавном повышении.

3.4 Оценка динамики синтеза вирусного антигена в исследуемых клеточных линиях при высокой множественности инфекции

В клетках СПЭВ в течение первых суток после заражения выявляемое количество внеклеточного антигена ВКЭ было ниже пороговой величины (Рисунок 4). Заметное нарастание было отмечено через 2 суток инфекции – концентрация выросла в 20 раз по сравнению с первыми сутками. Через 3 дня концентрация достигла пикового значения – оптическая плотность на этой точке составила 2,4 ед. Далее к 3-м и 4-м суткам количество вирусного антигена снизились на 0,2 и 0,4 ед. соответственно. Через 16 дней концентрация увеличилась до 2,1 ед.

В клеточной линии АрпК количество вирусного антигена, обнаруженное на первые сутки, было за пределами детекции (Рисунок 4). Через 2 дня количество антигена стало примерно в 8 раз выше, чем на предыдущей точке, и в 3 раза ниже, чем через два дня в клеточной линии СПЭВ. До 3-го дня инфекции нарастание концентрации внеклеточного антигена в культуре клеток АрпК происходило с меньшей эффективностью, чем в линии клеток СПЭВ. Характер кривой роста АрпК повторял динамику изменения количества антигена в СПЭВ на протяжении всего эксперимента. Через 3 дня после заражения разница концентраций в АрпК и СПЭВ сократилась в 2 раза. Через 4 дня эти величины практически сравнялись – количество вирусного антигена в клетках АрпК превысило таковое в СПЭВ на 0,1 ед. На этой точке было достигнуто пиковое значение для клеточной линии АрпК – 2,3 ед. Как и в СПЭВ, в АрпК на 5-е сутки было отмечено уменьшение концентрации вирусного антигена. Разница концентраций в этих клеточных линиях составила 0,2 ед. в пользу АрпК. Через 16 дней после заражения количество антигена в культуре АрпК увеличилось до уровня пикового значения, оставаясь выше, чем в СПЭВ на этой точке.

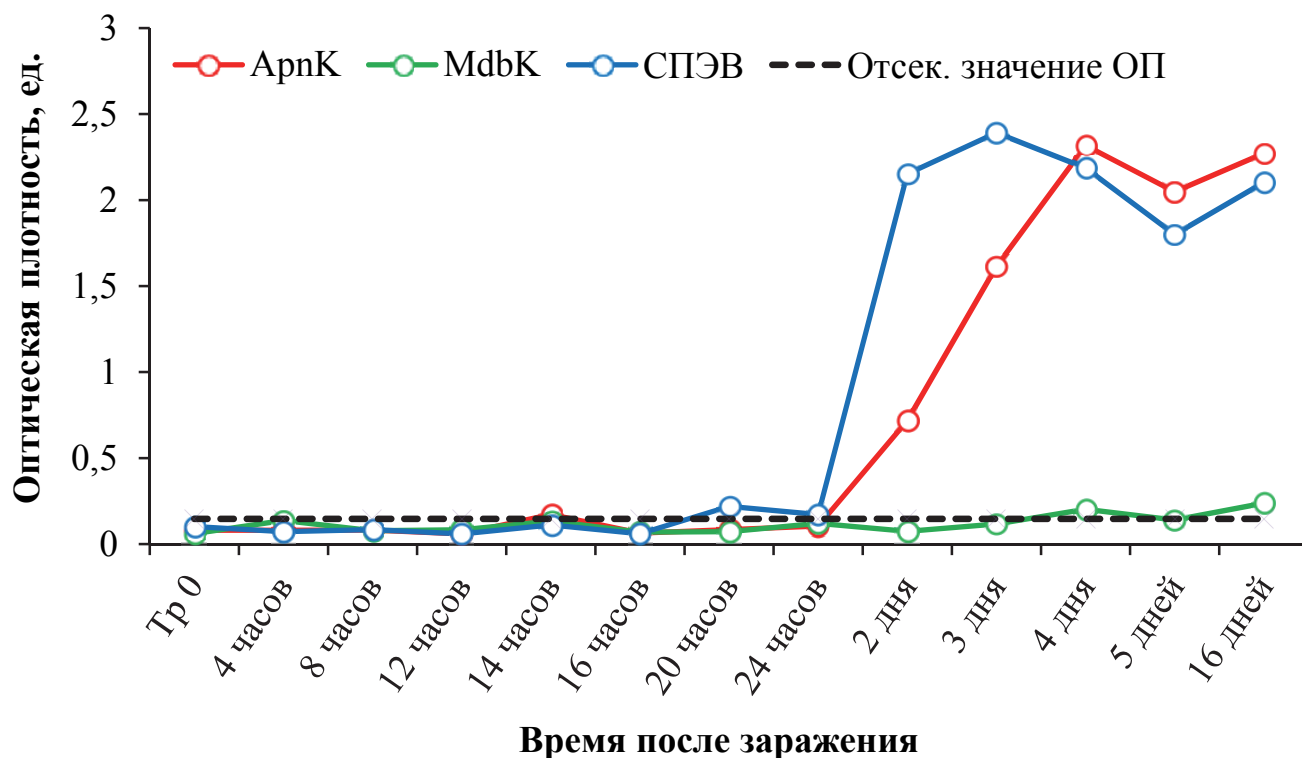


Рисунок 4 – Динамика накопления внеклеточного антигена ВКЭ в линиях клеток млекопитающих при острой инфекции (МИ = 10). По оси абсцисс – время сбора культуральной среды после заражения (в 1-е сутки сбор производился через 2–4 часа, далее ежедневно по 5-е сутки, а также на 16-й день после заражения). По оси ординат – концентрация антигена ВКЭ в клеточных линиях (ОП, ед.)

В клеточной линии случайного хозяина MdbK специфического нарастания концентрации вирусного антигена обнаружено не было (Рисунок 4). Значения концентрации на всех временных точках находились за пределами отсекающего значения ОП.

3.5 Динамика репродукции инфекционного вируса в исследуемых клеточных линиях при высокой множественности инфекции

Статистически значимое увеличение количества инфекционного ВКЭ в клеточной линии СПЭВ было отмечено через 16 ч после заражения ($p = 0,03$), что, вероятно, отражает синтез первой генерации инфекционных вирионов

(Рисунок 5). Делая измерения каждые 4 часа в течение первых суток после заражения, мы наблюдали последовательный рост концентрации инфекционного вируса. По истечении вторых суток было отмечено увеличение количества инфекционного ВКЭ до своего максимального значения (8,3 lg БОЕ/мл). Затем наблюдалось понижение концентрации на $\sim 0,3\text{--}0,4$ lg БОЕ/мл каждые сутки. Через 16 дней концентрация инфекционного вируса в клетках СПЭВ стала сопоставимой с таковой на точке 16 ч ($p = 0,08$).

В клетках восточноазиатской лесной мыши АрпК синтез первой генерации инфекционных вирионов так же, как и в СПЭВ, был отмечен через 16 ч после заражения ($p = 0,046$), но в меньшей концентрации (2,4 против 3,3 lg БОЕ/мл) (Рисунок 5). Тем не менее, уже через 14 ч после заражения между концентрациями инфекционного ВКЭ в АрпК и СПЭВ наблюдались статистически значимые различия ($p = 0,046$) и продолжали отмечаться до 48 ч ($p = 0,046\text{--}0,049$). Заметно, что на этом промежутке репродукция ВКЭ в клетках АрпК идёт менее интенсивно по сравнению с репродукцией в СПЭВ. Через 3 дня после заражения количество инфекционного вируса в клетках АрпК оставалось ниже (7,6 против 8 lg БОЕ/мл), хотя статистическая поддержка наблюдаемых различий была низкой ($p = 0,3$). Далее в клетках АрпК началось плавное снижение концентрации, при этом через 4 дня отмечались статистически значимые различия с культурой клеток СПЭВ ($p = 0,049$). Через 5 дней после заражения значения концентрации инфекционного ВКЭ в обеих клеточных линиях составили 7,3 lg БОЕ/мл. Через 16 дней концентрация инфекционного вируса в культуре клеток *A. peninsulae* составила 6,3 lg БОЕ/мл, в то время как в клетках СПЭВ она стала значительно меньше – 3,0 lg БОЕ/мл ($p = 0,043$).

В клеточной линии летучей мыши МдбК синтез первой генерации инфекционных вирионов происходил с существенной задержкой по сравнению с культурами клеток СПЭВ и АрпК: статистически значимое повышение концентрации инфекционного ВКЭ до 2,8 lg БОЕ/мл отмечено только через 20 ч после заражения ($p = 0,046$) (Рисунок 5).

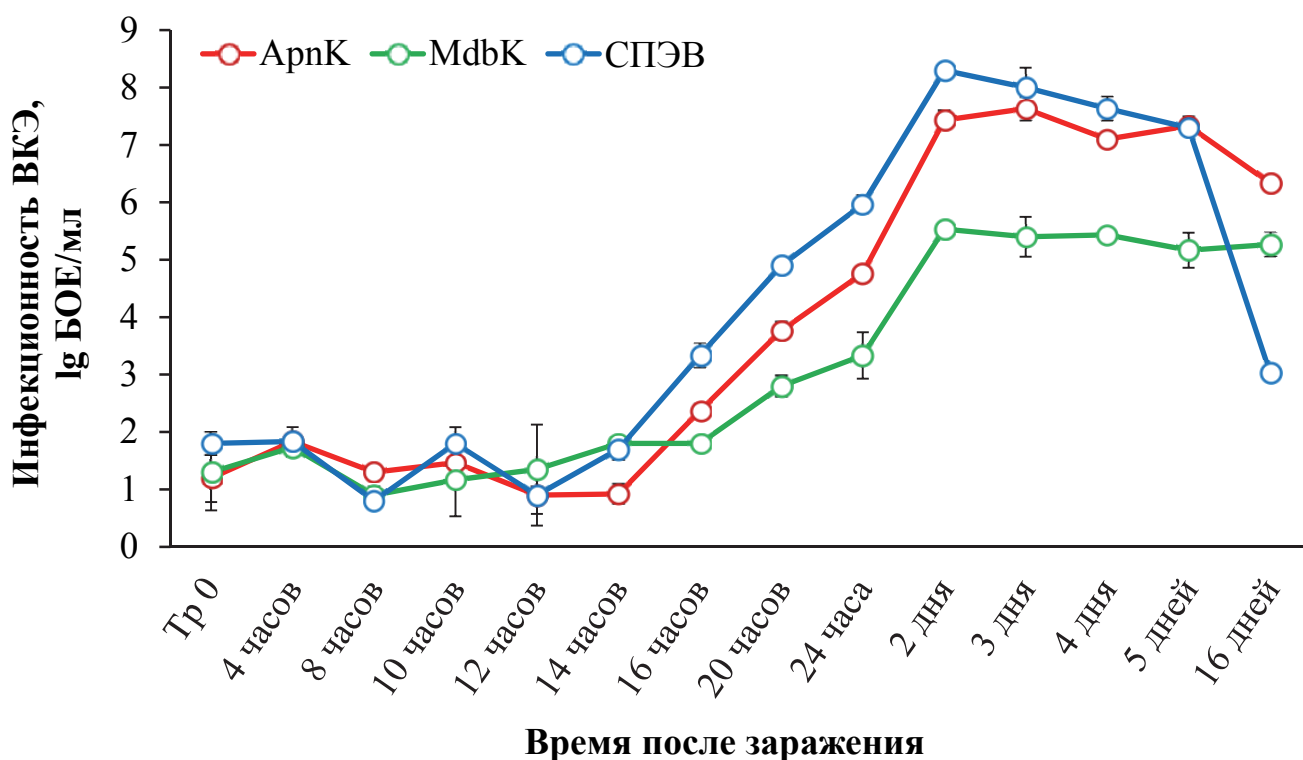


Рисунок 5 – Динамика накопления инфекционного вируса в линиях клеток млекопитающих при острой инфекции (МИ = 10) по исходным данным. По оси абсцисс – время сбора культуральной среды после заражения (в 1-е сутки сбор производился через 2–4 часа, далее ежедневно по 5-е сутки, а также на 16-й день после заражения). По оси ординат – концентрация инфекционного ВКЭ в клеточных линиях (lg БОЕ/мл). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение по результатам трёх независимых повторов

При сравнении концентрации инфекционного вируса в клетках MdbK с концентрациями в культурах СПЭВ и ApnK были выявлены статистически значимые различия на всех временных точках ($p = 0,043–0,049$) начиная с 16 ч. При этом продукция инфекционного ВКЭ в клеточной линии MdbK характеризовалась более низкими значениями. Уже через 16 ч после заражения количество инфекционного вируса в клетках MdbK статистически значимо отличалось от такового в СПЭВ и ApnK (Mdbk – 1,8 lg БОЕ/мл, СПЭВ – 3,3 lg БОЕ/мл ($p = 0,046$), ApnK – 2,4 lg БОЕ/мл ($p = 0,04$)), что, вероятно, обусловлено более поздним синтезом первой генерации вирионов. Тем

не менее, концентрация инфекционного ВКЭ в клеточной линии MdbK увеличивалась в течение первых 24 ч до 3,3 lg БОЕ/мл, оставаясь статистически значимо ниже таковой в клеточных линиях СПЭВ и AprnK (6,0 lg БОЕ/мл при $p = 0,046$ и 4,8 lg БОЕ/мл при $p = 0,043$ соответственно). Через 2 дня разница со СПЭВ и AprnK значительно возросла (8,3 lg БОЕ/мл и 7,4 lg БОЕ/мл при $p = 0,046$), несмотря на то, что на этой точке было достигнуто максимальное значение для MdbK (5,5 lg БОЕ/мл). Через 3 дня после заражения кривая концентрации инфекционного ВКЭ культуре клеток *M. sibiricus* вышла на плато (5,2–5,4 lg БОЕ/мл) (Рисунок 5).

Таким образом, ВКЭ способен репродуцироваться в линиях клеток резервуарного и случайного хозяев при высокой множественности заражения. При этом вирусная репродукция эффективнее протекает в клеточной линии резервуарного хозяина как на уровне репликации РНК ВКЭ, так и на уровне продукции инфекционного ВКЭ. Кроме того, в ходе проведённого эксперимента клеточная линия случайного хозяина продемонстрировала неспособность к накоплению вирусного белка.

ГЛАВА 4 ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА СПОСОБЕН К ПЕРСИСТЕНТНОЙ ИНФЕКЦИИ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ РЕЗЕРВУАРНОГО И СЛУЧАЙНОГО ХОЗЯЕВ НА ПРОТЯЖЕНИИ 6 МЕСЯЦЕВ

В ходе персистентной инфекции ЦПД наблюдалось во всех клеточных линиях, причём с 1-й по 9-ю неделю в ArnK и MdbK доля выживших клеток была сопоставима между собой, и к 9-й неделе составила 20 %. С 17-й по 25-ю неделю в клеточной линии ArnK отмечался восстановительный рост клеток до 100 % монослоя, тогда как плотность клеточного монослоя MdbK оставалась равна 20 %. Клеточная линия СПЭВ оказалась наиболее чувствительной к инфекции ВКЭ: монослой клеток во всех четырёх флаконах был практически полностью разрушен по истечении 2 недель эксперимента. Был сохранён небольшой «островок» клеток СПЭВ в одном из флаконов, и к 9-й неделе клеточный монослой в нём был восстановлен до уровня контрольного флакона с незаражёнными клетками. К 25-й неделе доля выживших клеток СПЭВ сократилась, составив около 30 %.

4.1 Сравнение динамики репликации вирусной РНК в клеточных линиях СПЭВ, ArnK и MdbK при персистентной инфекции

В клеточной линии СПЭВ статистически значимое нарастание концентрации внутриклеточной +РНК ВКЭ до 7,7 lg копий/мкл отмечено через 1 неделю после заражения ($p = 0,02$). Следует отметить, что начиная со 2-й недели клеточный монослой начал разрушаться, что, вероятно, было вызвано ЦПД вируса. В ходе дальнейшего эксперимента внутриклеточная +РНК ВКЭ была обнаружена на 9-й, 17-й и 20-й неделях в значениях, сопоставимых друг с другом ($p = 0,3$) (Рисунок 6).

В клетках восточноазиатской лесной мыши ArnK статистически значимое повышение концентрации внутриклеточной +РНК ВКЭ до 8,7 lg копий/мкл

наблюдалось через 1 неделю после заражения ($p = 0,02$) (Рисунок 6). Синтез геномных копий +РНК ВКЭ происходил эффективнее по сравнению с культурой СПЭВ, причём различия были статистически значимы ($p = 0,02$). Пиковой отметки концентрация в АрпК достигла через 2 недели после заражения, статистически значимо не отличаясь от значения на предыдущей точке ($p = 0,6$). Далее эффективность репликации начала снижаться – через 3 недели после заражения концентрация упала до $7,8 \lg$ копий/мкл, а через 4 недели достигла значения $5,7 \lg$ копий/мкл. Затем эффективность репликации начала увеличиваться и стабилизировалась на уровне $\sim 7,8 \lg$ копий/мкл до конца эксперимента. На точках 9, 17 и 20 недель количество геномных копий вирусной +РНК в клеточной линии АрпК было приблизительно в 10 000 выше, чем в СПЭВ на этих же точках.

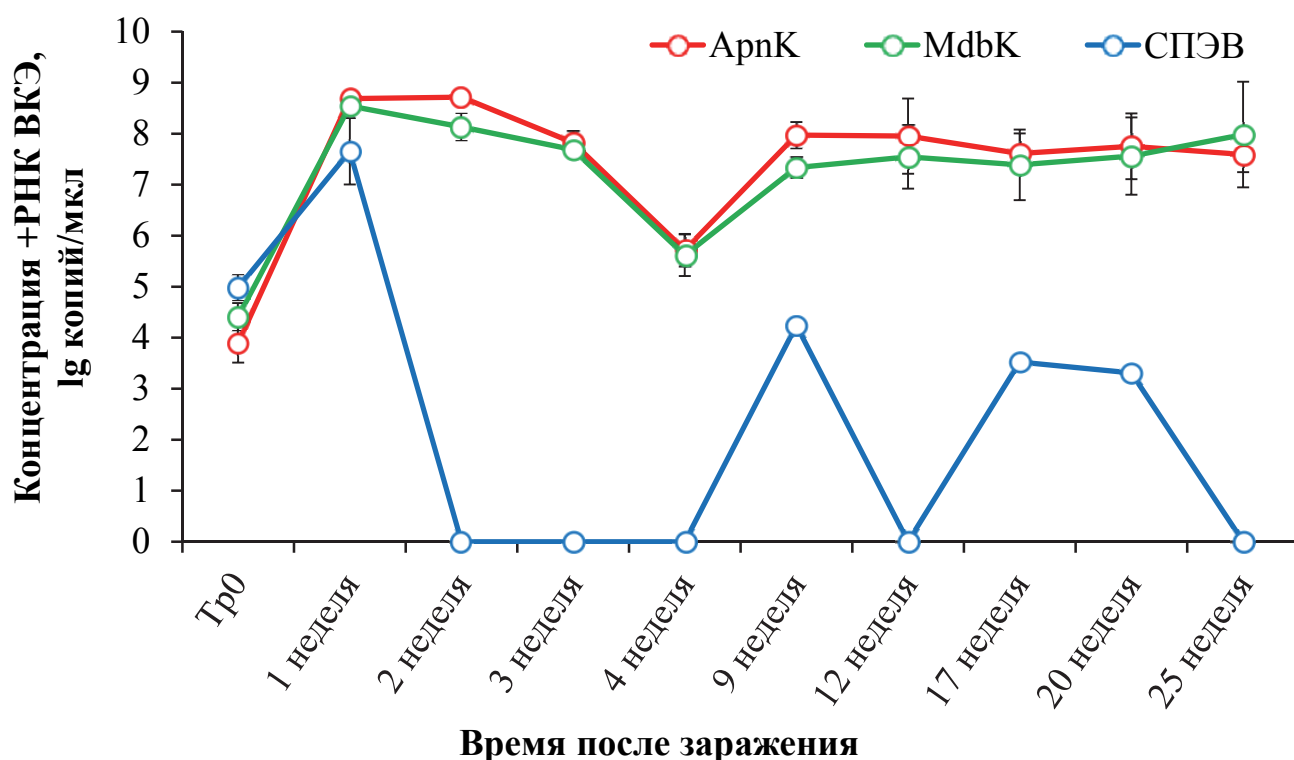


Рисунок 6 – Динамика накопления геномной +РНК ВКЭ в линиях клеток млекопитающих при персистентной инфекции (МИ = 0,1) по исходным данным. По оси абсцисс – время сбора культуральной среды после заражения (недели). По оси ординат – концентрация инфекционного ВКЭ в клеточных линиях (\lg копии/мкл). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение по результатам трёх независимых повторов

В клетках сибирской ночницы MdbK концентрация внутриклеточной +РНК ВКЭ статистически значимо нарастала через 1 неделю после заражения ($p = 0,02$). Синтез геномных копий вирусной +РНК в этой точке проходил более интенсивно по сравнению с культурой СПЭВ (Рисунок 6), наблюдаемые различия были статистически значимы (8,5 против 7,7 lg копий/мкл; $p = 0,02$). Кривая изменения количества концентрации вирусной +РНК в культуре клеток MdbK повторяла характер изменения в клеточной линии ArnK: различия с высокой статистической поддержкой были обнаружены только на двух точках – 2 и 9 недель после заражения ($p = 0,02$). При сравнении значений концентрации в линии клеток Mdbk со значениями в культуре СПЭВ различие составило 3 порядка в точке 9 недель, 4 порядка – в точках 17 и 20 недель.

4.2 Оценка динамики синтеза вирусного антигена в исследуемых клеточных линиях при персистентной инфекции

В клеточной линии СПЭВ динамика накопления внеклеточного антигена характеризовалась значительным подъёмом концентрации через 1 неделю после заражения ($p = 0,02$) до 2,0 ед. (Рисунок 7). На дальнейших этапах эксперимента антиген в клеточной линии СПЭВ не выявлялся.

В отличие от СПЭВ, клеточная линия резервуарного хозяина ArnK показала высокую способность к продукции вирусного антигена (Рисунок 7). Статистически значимое нарастание концентрации до 1,8 ед. отмечено в первую неделю после заражения ($p = 0,03$), при этом различия со СПЭВ на этой точке также были статистически значимы ($p = 0,03$). Через 2 недели концентрация снизилась в 2 раза, через 3 недели – в 4,5 раза. В ходе дальнейших наблюдений вирусный антиген выявляли в невысоких концентрациях, сопоставимых через 4, 9, 12, 17 и 20 недель инфекции ($p = 0,1–0,9$). Через 24 и 25 недель значения концентрации внеклеточного антигена были ниже предела детекции.

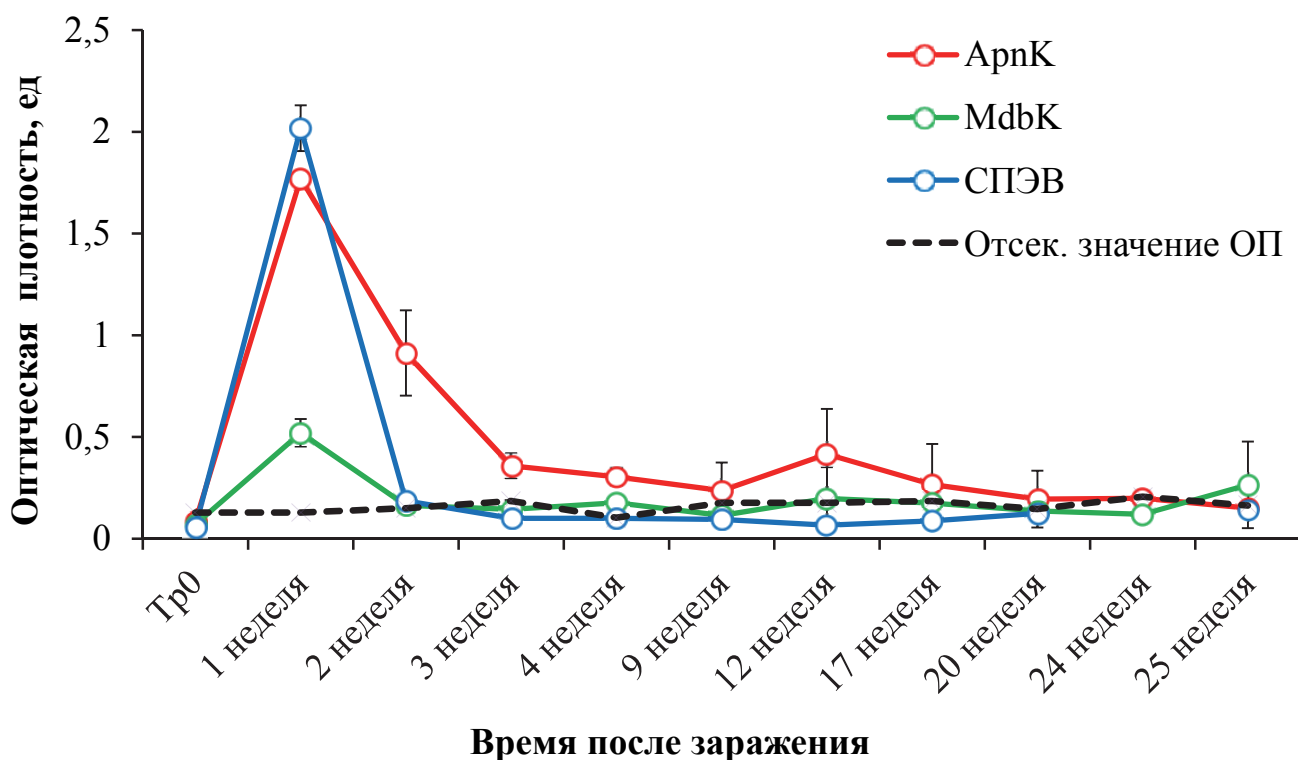


Рисунок 7 – Динамика накопления внеклеточного антигена ВКЭ в линиях клеток млекопитающих при персистентной инфекции (МИ = 0,1) по исходным данным. По оси абсцисс – время сбора культуральной среды после заражения (недели). По оси ординат – концентрация инфекционного ВКЭ в клеточных линиях (ОП, ед.). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение по результатам трёх независимых повторов

В культуре клеток случайного хозяина MdbK рост концентрации внеклеточного антигена до 0,5 ед. наблюдался через 1 неделю после заражения, различие со СПЭВ и ApnK было статистически значимым ($p = 0,02$ и $p = 0,03$ соответственно) (Рисунок 7). Накопления антигена ВКЭ не происходило: значения концентрации на подавляющем большинстве временных точек были ниже отсекающего значения ОП. В детектируемых количествах антиген был выявлен через 4 недели (0,2 ед.) и через 25 недель после заражения (0,3 ед.), причём концентрация в клеточной линии MdbK через 4 недели статистически значимо отличалась от таковой в культуре клеток ApnK ($p = 0,02$).

4.3 Динамика репродукции инфекционного вируса в исследуемых клеточных линиях при персистентной инфекции

В культуре клеток СПЭВ статистически значимое повышение концентрации инфекционного вируса было отмечено через 1 неделю после заражения ($p = 0,02$). Через 2 недели эффективность продукции инфекционного вируса в СПЭВ статистически значимо снизилась с 5,9 до 3,9 lg БОЕ/мл ($p = 0,02$), что сопутствовало началу разрушения клеточного монослоя. В ходе дальнейшего эксперимента инфекционный вирус в этой клеточной линии не обнаруживался (Рисунок 8).

В клетках резервуарного хозяина АрпК статистически значимое нарастание концентрации инфекционного ВКЭ наблюдалось через 1 неделю после заражения ($p = 0,02$), значение которой было сопоставимо с концентрацией в СПЭВ (6,4 против 5,9 lg БОЕ/мл; $p = 0,06$) (Рисунок 8). Через 2 недели разница концентраций в АрпК и СПЭВ статистически значимо увеличилась ($p = 0,02$) из-за резкого снижения эффективности продукции инфекционного вируса в клетках СПЭВ. В отличие от СПЭВ, последующее уменьшение количества инфекционного вируса в культуре клеток *A. peninsulae* имело плавный ступенчатый характер: первое статистически значимое снижение было отмечено с 1-й по 3-ю неделю ($p = 0,02$), второе – с 12-й по 24-ю неделю ($p = 0,02$). Через 25 недель после заражения в клеточной линии АрпК снова наблюдался рост концентрации инфекционного ВКЭ, хотя статистически значимых отличий от концентрации на 24-й неделе обнаружено не было ($p = 0,4$).

Так же, как в клеточных линиях СПЭВ и АрпК, в культуре клеток случайного хозяина МdbК статистически значимое увеличение концентрации инфекционного вируса было отмечено через 1 неделю после заражения (5,4 lg БОЕ/мл; $p = 0,02$) (Рисунок 8). Инфекционный ВКЭ обнаруживался на этой точке в меньшем количестве по сравнению со СПЭВ и АрпК, при этом разница была статистически значима (5,9 lg БОЕ/мл при $p = 0,03$ и 6,4 lg БОЕ/мл при $p = 0,02$ соответственно). Несмотря на то, что через 2 недели продукция

инфекционного ВКЭ в культуре MdbK замедлилась, разница концентраций в MdbK и СПЭВ увеличилась в пользу MdbK (5,0 против 3,9 lg БОЕ/мл) с высокой степенью статистической значимости ($p = 0,02$).

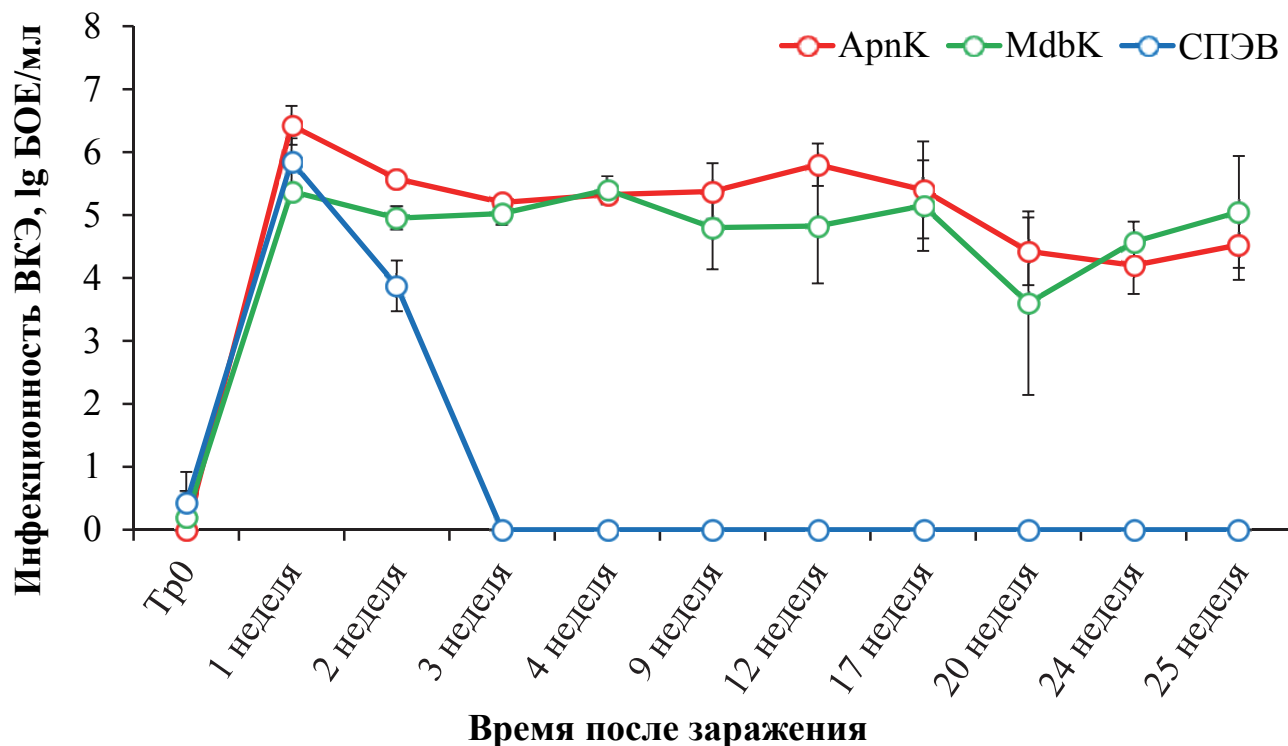


Рисунок 8 – Динамика накопления инфекционного вируса в линиях клеток млекопитающих при персистентной инфекции (МИ = 0,1) по исходным данным. По оси абсцисс – время сбора культуральной среды после заражения (недели). По оси ординат – концентрация инфекционного ВКЭ в клеточных линиях (lg БОЕ/мл). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение по результатам трёх независимых повторов

При сравнении концентрации инфекционного вируса в MdbK с таковой в ApnK также были подтверждены статистически значимые различия ($p = 0,02$). Дальнейшие изменения количества инфекционного вируса в культуре MdbK носили линейный характер: на протяжении всего времени эксперимента концентрация стабильно удерживалась на уровне 4,8–5,4 lg БОЕ/мл (Рисунок 8). Более низким значением характеризовалась концентрация на 20-й неделе после заражения, статистически значимо отличаясь от таковой на 17-й неделе (3,6

против $5,2 \lg \text{БОЕ/мл}$; $p = 0,04$). Вероятно, снижение количества инфекционного ВКЭ на этой точке обусловлено высоким стандартным отклонением. При сравнении значений эффективности репродукции ВКЭ в клеточных линиях MdbK и AprnK с 3-й по 25-ю неделю статистически значимых различий выявлено не было ($p = 0,08\text{--}0,8$).

Таким образом, клеточные линии резервуарного и случайного хозяев поддерживают персистенцию ВКЭ на протяжении по меньшей мере 6 месяцев при низкой множественности заражения. Эффективность процессов репликации РНК ВКЭ и продукции инфекционного ВКЭ была сопоставима в этих клеточных линиях, однако линия клеток летучей мыши продемонстрировала неспособность, как и при высокой множественности заражения, к накоплению антигена ВКЭ. Линия клеток СПЭВ не поддерживает продукцию жизнеспособного вируса при персистентной инфекции.

4.4 Оценка согласованности стадий репродукции вируса клещевого энцефалита в исследуемых клеточных линиях

В клеточной линии СПЭВ коэффициент корреляции r между эффективностью репликации РНК ВКЭ и продукцией инфекционного ВКЭ составил 0,6 ($p = 0,06$) на ранней и 1 ($p = 0,0001$) – на поздней стадии острой инфекции (Таблица 5). При персистентной инфекции соответствующий коэффициент составил 0,5 ($p = 0,2$). Поскольку статистически значимая корреляция отмечается только на поздней стадии острой инфекции, сбалансированность процессов вирусной репликации и продукции инфекционного вируса на этом периоде инфекции соответствовала значению r и составила 1 балл. По итогу репродуктивный баланс соотношения стадий РНК/инфекционный вирус был равен 1.

Таблица 5 – Оценка сбалансированности стадий репродукции ВКЭ в линии клеток СПЭВ

Стадии репродукции	СПЭВ, период инфекции и вирусная нагрузка	r	p	Согласованность процессов (баллы)	Репродуктивный баланс стадий
РНК/ инфекционный ВКЭ	Ранний, МИ = 10	0,6	0,06	0	1
	Поздний, МИ = 10	1	0,0001	1	
	Персистенция, МИ = 0,1	0,5	0,2	0	
РНК/ полипротеин	Ранний, МИ = 10	–	–	0	0,8
	Поздний, МИ = 10	0,8	0,04	0,8	
	Персистенция, МИ = 0,1	–	–	0	
Полипротеин/ инфекционный ВКЭ	Ранний, МИ = 10	–	–	0	0,8
	Поздний, МИ = 10	0,8	0,04	0,8	
	Персистенция, МИ = 0,1	–	–	0	
Индекс репродуктивного баланса СПЭВ					2,6

Примечание (здесь и в Таблицах 6, 7): при высокой статистической значимости корреляции ($p < 0,05$) согласованность процессов (первый столбец) выражается количеством баллов, соответствующих коэффициенту r . При низкой статистической значимости ($p > 0,05$) коэффициент r оценивается в 0 баллов. Репродуктивный баланс стадий жизненного цикла ВКЭ оценивается путём сложения баллов разных периодов инфекции для попарно анализируемых процессов: РНК/инфекционный ВКЭ, РНК/полипротеин и полипротеин/инфекционный ВКЭ. Общий «индекс репродуктивного баланса» ВКЭ рассчитывали как сумму баллов трёх стадий репродукции.

При оценке согласованности между эффективностью репликации РНК ВКЭ и трансляцией вирусного полипротеина коэффициент корреляции составил 0,8 ($p = 0,04$) на поздней стадии острой инфекции (Таблица 5). Коэффициент r соответствующих стадий не был определён для ранней стадии острой инфекции и персистентной инфекции в силу неэффективности процесса вирусной трансляции на этих этапах в линии клеток СПЭВ: значения концентрации антигена ВКЭ были за пределами пороговой величины (Рисунки 4, 7). Потому согласованность рассматриваемых показателей составила 0 баллов в обоих случаях. При поздней стадии острой инфекции сбалансированность процессов соответствовала значению r и составила 0,8 балла. Репродуктивный баланс соотношения стадий РНК/полипротеин был равен 0,8 (Таблица 5).

Оценка согласованности между трансляцией вирусного полипротеина и продукцией инфекционного ВКЭ в клеточной линии СПЭВ показала идентичный результат: репродуктивный баланс стадий был равен 0,8 (Таблица 5). В итоге индекс репродуктивного баланса всех стадий жизненного цикла ВКЭ в клеточной линии СПЭВ составил 2,6 (Таблица 5).

В клеточной линии АрпК коэффициент корреляции между эффективностью репликации РНК ВКЭ и продукцией инфекционного ВКЭ составил 0,69 ($p = 0,03$) как на ранней, так и на поздней стадиях острой инфекции (Таблица 6). При персистентной инфекции соответствующий коэффициент был равен 0,73 ($p = 0,008$). Таким образом, во всех трёх периодах инфекции сбалансированность этих процессов равнялась значению r и составила 0,69, 0,69 и 0,73 балла соответственно. Репродуктивный баланс соотношения стадий РНК/инфекционный вирус был равен 2,11.

При оценке согласованности между эффективностью репликации РНК ВКЭ и трансляцией вирусного полипротеина коэффициент корреляции составил 0,1 ($p = 0,1$) на поздней стадии острой инфекции (Таблица 6). Для ранней стадии острой инфекции анализ соответствующих стадий не проводился в силу неэффективности процесса трансляции на этом этапе: значения концентрации антигена ВКЭ в линии клеток АрпК, аналогично таковым в СПЭВ, были

за пределами пороговой величины (Рисунок 4). В то же время на поздней стадии острой инфекции корреляция была статистически незначима. Потому согласованность рассматриваемых показателей составила 0 баллов для обоих периодов инфекции. При персистентной инфекции коэффициент r был равен 0,9 ($p = 0,001$). Сбалансированность процессов при персистентной инфекции равнялась значению r и составила 0,9 балла. В итоге репродуктивный баланс соотношения стадий РНК/полипротеин был равен 0,9.

Таблица 6 – Оценка сбалансированности стадий репродукции ВКЭ в линии клеток ArpK

Стадии репродукции	ArpK, период инфекции и вирусная нагрузка	r	p	Согласованность процессов (баллы)	Репродуктивный баланс стадий
РНК/инфекционный ВКЭ	Ранний, МИ = 10	0,69	0,03	0,69	2,11
	Поздний, МИ = 10	0,69	0,03	0,69	
	Персистенция, МИ = 0,1	0,73	0,008	0,73	
РНК/полипротеин	Ранний, МИ = 10	–	–	0	0,9
	Поздний, МИ = 10	0,1	0,1	0	
	Персистенция, МИ = 0,1	0,9	0,001	0,9	
Полипротеин/инфекционный ВКЭ	Ранний, МИ = 10	–	–	0	0,74
	Поздний, МИ = 10	0,03	0,1	0	
	Персистенция, МИ = 0,1	0,74	0,007	0,74	
Индекс репродуктивного баланса ArpK					3,75

Примечание: см. примечание к Таблице 5.

Согласованность между трансляцией вирусного полипротеина и продукцией инфекционного ВКЭ в клеточной линии AprnK оценивалась аналогичным образом: статистически значимая корреляция была обнаружена только при персистентной инфекции. Репродуктивный баланс стадии был равен 0,74. Итоговый индекс репродуктивного баланса всех стадий жизненного цикла ВКЭ в клеточной линии AprnK составил 3,8 (Таблица 6).

В клеточной линии MdbK коэффициент корреляции между эффективностью репликации РНК ВКЭ и продукцией инфекционного ВКЭ составил 0,9 ($p = 0,002$) на ранней и 0,2 ($p = 0,1$) – на поздней стадии острой инфекции (Таблица 7). При персистентной инфекции соответствующий коэффициент был равен 0,3 ($p = 0,2$). Статистически значимая корреляция выявлена только на ранней стадии острой инфекции. Таким образом, сбалансированность процессов вирусной репликации и продукции инфекционного ВКЭ на этом периоде инфекции составила 0,9 балла. Репродуктивный баланс соотношения стадий РНК/инфекционный вирус был равен 0,9.

Корреляционный анализ между репликацией РНК ВКЭ и трансляцией вирусного полипротеина не проводился, как и между трансляцией вирусного полипротеина и продукцией инфекционного ВКЭ. В силу неэффективности процесса вирусной трансляции в этой клеточной линии (Рисунки 4, 7) согласованность рассматриваемых показателей составила 0 баллов на каждом периоде инфекции. В итоге репродуктивный баланс соотношения стадий РНК/полипротеин и полипротеин/инфекционный ВКЭ был равен 0 в обоих случаях (Таблица 7).

Итоговый индекс репродуктивного баланса всех стадий жизненного цикла ВКЭ в клеточной линии MdbK составил 0,9 (Таблица 7).

Таблица 7 – Оценка сбалансированности стадий репродукции ВКЭ в линии клеток MdbK

Стадии репродукции	MdbK, период инфекции и вирусная нагрузка	r	p	Согласованность процессов (баллы)	Репродуктивный баланс стадий
РНК/инфекционный ВКЭ	Ранний, МИ = 10	0,9	0,002	0,9	0,9
	Поздний, МИ = 10	0,2	0,1	0	
	Персистенция, МИ = 0,1	0,3	0,2	0	
РНК/полипротеин	Ранний, МИ = 10	–	–	0	0
	Поздний, МИ = 10	–	–	0	
	Персистенция, МИ = 0,1	–	–	0	
Полипротеин/инфекционный ВКЭ	Ранний, МИ = 10	–	–	0	0
	Поздний, МИ = 10	–	–	0	
	Персистенция, МИ = 0,1	–	–	0	
Индекс репродуктивного баланса MdbK					0,9

Примечание: см. примечание к Таблице 5.

Таким образом, сравнивая полученный в разных линиях клеток индекс репродуктивного баланса (СПЭВ – 2,6, ApnK – 3,8, MdbK – 0,9), мы можем прийти к выводу, что в клеточной линии восточноазиатской лесной мыши процессы репликации РНК ВКЭ, трансляции вирусного полипротеина и продукции инфекционного вируса в наибольшей степени согласованы между собой.

ГЛАВА 5 АДАПТАЦИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА К РАЗНЫМ КУЛЬТУРАМ КЛЕТОК АССОЦИИРОВАНА СО СПЕЦИФИЧНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ В ВИРУСНОМ ГЕНОМЕ

5.1 Изменения в геноме вируса клещевого энцефалита

На первом этапе нами был секвенирован полный геном исходного изолята 92М. Нуклеотидная последовательность депонирована в GenBank с номером доступа MT974474. Длина генома составила 10922 н.о., геном содержит 5'-НТР длиной 133 н.о., открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин, и 3'-НТР длиной 545 н.о. Вирус относится к сибирскому субтипу, эволюционная линия «Васильченко». В геноме отмечены вырожденные нуклеотиды в позициях 510 (s), 515 (y), 886 (y), 3362 (r), 7974 (k), 8139 (r) и 9229 (r). По нашему мнению, это может служить признаком незавершённой адаптации изолята к культуре клеток СПЭВ, используемой для рутинного пассирования вируса.

С использованием генома исходного варианта 92М в качестве референс-генома мы собрали 8 полногеномных последовательностей линий ВКЭ, независимо друг от друга персистировавших в течение 25 недель в культурах клеток резервуарного и случайного хозяев. Эволюционные линии ВКЭ из клеток *A. peninsulae* АрпК обозначены как А1, А2, А3 и А4; линии из клеток *M. sibiricus* МdbК – М1, М2, М3 и М4. Генетические дистанции между персистентными вариантами и исходным геномом варьировали от 0,00064 до 0,00083 нуклеотидных замен на сайт (Таблица 8). Существенных различий ни во внутри-, ни в межгрупповом разнообразии вариантов отмечено не было: генетическая дистанция в парах «АрпК group» – 92М и «МdbК group» – 92М составила 0,00015 и 0,0017 замен на сайт соответственно. Межгрупповая дистанция «АрпК group» – «МdbК group» составляет 0,00003 замены на сайт. Всего выявлено 44 переменные нуклеотидные позиции, в которых произошло в среднем 7,25 мутации на геном в линиях А1–А4 и по 6,25 мутации на геном в линиях М1–М4.

Таблица 8 – Генетическая вариабельность ВКЭ 92М после персистенции в культурах клеток AprnK и MdbK

Эволюционные линии ВКЭ	Количество нуклеотидных замен	Среднее количество нуклеотидных замен в группе	Генетическая дистанция к 92М*	Средняя групповая дистанция к 92М
A1	10	7,25	0,00046	0,00055
A2	5		0,00028	
A3	7		0,00073	
A4	7		0,00073	
M1	6	6,25	0,00064	0,00057
M2	10		0,00083	
M3	4		0,00055	
M4	5		0,00028	

Примечание: * – указано количество нуклеотидных замен на сайт между соответствующей последовательностью и последовательностью изолята 92М. Анализ выполнен с использованием модели Maximum Composite Likelihood с использованием 1, 2 и 3 кодонов. Двусмысленные и сомнительные позиции исключены из анализа. Итоговый набор данных включал 10 907 позиций. Анализ выполнен с помощью MEGA X.

5.2 Изменения в структуре белков вируса клещевого энцефалита

Перечень обнаруженных мутаций и (при наличии) соответствующих аминокислотных замен приведён в Таблице 9. В целом можно отметить, что в каждой группе нуклеотидные мутации произошли, по меньшей мере, в одной линии в 3'- и в 5'-НТР, а также в большинстве генов, кодирующих вирусные белки. Однако гены, кодирующие белки С и NS2В, остались неизменёнными на нуклеотидном уровне во всех исследованных изолятах ВКЭ.

Интересно, что мутации в геномных позициях E2169, E2202, E2241, E2397 и E2398 обнаруживались во всех 8 исследованных изолятах. Возможно,

это следствие изменения генотипа ВКЭ при адаптации к культуре клеток СПЭВ в процессе формирования рабочего стока вируса. Все эти мутации локализованы в пределах белка Е, однако только одна из них приводит к аминокислотной замене в белке (a2398c → M476L). Поскольку для выяснения происхождения этих мутаций требуются дополнительные исследования, они были исключены из дальнейшего анализа.

Таблица 9 – Локализация и состав нуклеотидных и аминокислотных замен, возникших за время персистенции изолята ВКЭ 92М в клеточных линиях АрпК и MdbK

Локус	Позиция	Исходный нуклеотид	Мутация	Проявление в линиях	Изменяемая аминокислота
5'-НТР	85	t	c	A3, A4, M2, M3, M4	—
prM	717	t	c + t (Y)	A1	silent
M	829	c	t	M2	H28Y
M	906	c	t	A3	silent
E	1098	t	c + t (Y)	M4	silent
E	1171	g	a	A1	D67N
E	1278	c	t	M1	silent
E	1336	g	c	A3	E122Q
E	1436	a	t, c	M1, M3	E155V, A
E	1447	g	a + g (R)	M4	G159R
E	1496	c	t	A4	T175I
E	1573	g	a	M2	E201R
E	1579	g	t	A2	D203Y
E	1580	a	g	M1	D203G
E	1800	t	a	M1	silent
E	1804	g	a	M3	G278R
E	1808	c	a	A4	T279K
E	1817	a	g	M4	H282R
E	2169	c	t	A1–A4, M1–M4	silent
E	2202	c	t	A1–A4, M1–M4	silent
E	2241	c	t	A1–A4, M1–M4	silent

Продолжение таблицы 9

Локус	Позиция	Исходный нуклеотид	Мутация	Проявление в линиях	Изменяемая аминокислота
E	2286	c	t	M2	silent
E	2316	c	c + t (Y)	A1	silent
E	2397	t	c	A1–A4, M1–M4	silent
E	2398	a	c	A1–A4, M1–M4	M476L
NS1	2613	g	a + g (R)	A1	silent
NS1	2930	c	t	A1	A157V
NS1	3031	g	a	M2	G191S
NS1	3060	c	t	A1	silent
NS1	3202	c	t	A4	silent
NS2A	3822	t	c + t (Y)	A2	silent
NS3	5172	g	a + g (R)	A3	silent
NS3	5304	g	a + g (R)	A2	silent
NS3	6058	c	a	M2	L487I
NS3	6274	g	g + c (S)	A4	V559L
NS4A	6560	a	g	A3, A4	E33G
NS4A	6660	t	a	A3	silent
NS4A	6770	a	t	M2, M3, M4	N103I
NS4B	6953	c	a	A4	T15K
NS4B	6967	g	a	A1, A2, A3	E20K
NS5	8999	c	c + t (Y)	A4	A445V
NS5	9053	t	g + t (K)	A1	L463R
NS5	9147	t	c + t (Y)	M2	silent
NS5	9569	a	a + c (M)	A1	D635A
NS5	9616	c	a + c (M)	M2	H651N
NS5	10339	t	g	M2	L892V
3'-HTP	10430	a	c	M1	—
3'-HTP	10458	a	g	A2	—
3'-HTP	10586	a	g	A1, M1	—

В процессе персистентной инфекции в клетках *ApnK* в геноме ВКЭ появились мутации, приводящие к аминокислотным заменам в белках E, NS1, NS3, NS4A, NS4B и NS5 (Таблица 10). В белке M изменений при адаптации к *ApnK* не возникло. В белке E выявлены аминокислотные замены D67N (линия A1), E122Q (A3), T175I (A4), D203Y (A2) и T279K (A4). Каждая из замен приводит к изменению класса аминокислоты, относительному повышению заряда и/или изменению гидрофобности участка белка. В белках NS1 и NS3 произошло по одной замене, не приводящей к изменению физико-химических свойств белка (A157V и V559L соответственно). В белке NS4A в двух линиях (A3 и A4) отмечена замена E33G, приводящая к повышению относительного заряда и гидрофобности соответствующего участка белка. Изменения в белке NS4b отмечены во всех 4 линиях, персистировавших в клетках *ApnK*. Замена T15K произошла в линии A4, а замена E20K обнаружена в остальных трёх линиях A1–A3. Обе замены приводят к изменению класса аминокислоты и заряда соответствующей позиции. В белке NS5 произошла одна замена в линии A4 (A445V) и две замены в линии A1 (L463R и D635A).

При адаптации к клеткам *MdbK* появились мутации в белках M (H28Y), E (E155V, E155A, G159R, E201R, D203G, G278R H282R), NS1 (G191S), NS3 (L487I), NS4A (N103I) и NS5 (H651N и L892V). По сравнению с *ApnK* отмечаются более частые изменения в белке E, приводящие, как правило, к изменению гидрофобности и повышению заряда мутировавших позиций. Наиболее специфичными для *MdbK* оказались изменения в белках E и NS4A. В белке E в двух линиях ВКЭ произошла замена аспарагиновой кислоты на глицин в позиции 203, а в белке NS4A у трёх линий выявлена замена аспарагина на изолейцин, что приводит к сильному повышению гидрофобности позиции 103. В отличие от *ApnK*, при адаптации к *MdbK* не произошло изменений в белке NS4B.

Таблица 10 – Специфичность изменений в геноме ВКЭ в зависимости от вида клетки-хозяина

Схема генома	Мутировавшие позиции*	Количество замен в А-линиях	Количество замен в М-линиях
5'-НТР	85	2	3
С	нет	0	0
prM	нет	0	0
М	28	0	1
Е	67	1	0
	122	1	0
	155	0	2
	159	0	1
	175	1	0
	201	0	1
	203	1	1
	278	0	1
	279	1	0
	282	0	1
NS1	157	1	0
	191	0	1
NS2A	нет	0	0
NS2B	нет	0	0
NS3	487	0	1
	559	1	0
NS4A	33	2	0
	103	0	3
NS4B	15	1	0
	20	3	0

Продолжение таблицы 10

Схема генома	Мутировавшие позиции*	Количество замен в А-линиях	Количество замен в М-линиях
NS5	445	1	0
	463	1	0
	635	1	0
	651	0	1
	892	0	1
3'-НТР	10430	0	1
	10458	1	0
	10586	1	1

Примечание: * – серым цветом выделены гены, в которых не произошло аминокислотных мутаций при персистенции в любой клеточной линии; зелёным цветом – мутации, неоднократно появлявшиеся у линий ВКЭ, персистировавших в клетках MdbK (М-линии); красным цветом – мутации, неоднократно появлявшиеся у линий ВКЭ, персистировавших в клетках ArpK (А-линии); оранжевым цветом – мутации, с равной частотой возникавшие в клетках ArpK и MdbK.

В белках С и NS4В аминокислотные замены отсутствовали, поскольку они, как отмечено ранее, остались интактными на нуклеотидном уровне. Белки ргМ и NS2А, несмотря на наличие нуклеотидных мутаций, не претерпели изменений в аминокислотном составе ни в одной из клеточных линий (Таблица 10).

С учётом вышесказанного следует подчеркнуть, что при адаптации ВКЭ к клеточной линии резервуарного хозяина ArpK наиболее видоспецифичные по клетке-хозяину изменения произошли в белках NS4А и NS4В. При адаптации к клеточной линии случайного хозяина MdbK были более характерны замены в белках Е и NS4А. Однако ни одна замена не была абсолютно необходимой для адаптации к любой из клеточных линий.

Таким образом, в линии клеток как резервуарного, так и случайного хозяев происходят генетические и фенотипические изменения генома ВКЭ в ходе его адаптации к внутриклеточной среде и поверхностным клеточным рецепторам этих млекопитающих. Видоспецифичные для линии клеток *M. sibiricus* мутации вирусного генома затрагивают как структурные (белок Е), так и неструктурные (белок NS4A) его части, тогда как для клеточной линии *A. peninsulae* видоспецифичные мутации выявлялись только в неструктурной части (белки NS4A и NS4B).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во время моделирования персистентной инфекции сильное влияние ЦПД на клетки СПЭВ явилось возможной причиной разрушения монослоя клеток и, как следствие, нарушения процесса репликации, продукции инфекционного вируса и наработки вирусного антигена (Рисунки 6, 7, 8). Одной из особенностей репродукции ВКЭ в СПЭВ было обнаружение +РНК ВКЭ на 9-й, 17-й и 20-й неделях при отсутствии инфекционного вируса в культуральной среде (Рисунки 6, 8). Вирусный полипротеин и жизнеспособный вирус обнаруживались только на 1–2-й неделях эксперимента (Рисунки 7, 8), когда монослой клеток СПЭВ ещё не был разрушен.

При моделировании острой инфекции репродукция ВКЭ в клеточной СПЭВ проходила более эффективно, чем в новых линиях клеток. Например, можно отметить, что за один и тот же промежуток времени в клетках СПЭВ отмечается три этапа плато на кривой роста концентрации +РНК ВКЭ, тогда как в ArpK таких ступеней только две, а в MdbK кривая роста концентрации +РНК практически равномерная (Рисунок 3). Если предположить, что эти ступени отражают включение +РНК в новые дочерние вирионы, которые затем выводятся из клетки, то теоретически за один и тот же период времени в клетках СПЭВ завершились три массовых генерации вирионов, в клетках ArpK – только две, а в MdbK генерация новых вирионов вообще не была настолько согласованной и обильной, чтобы это отразилось на концентрации внутриклеточной +РНК. Однако на поздних сроках инфекции концентрация вирусной РНК в СПЭВ резко снизилась, что, вероятнее всего, связано с разрушением заражённых клеток вследствие ЦПД вируса (Рисунок 3). Действительно, ранее было показано, что на 2–3-й день инфекции в клетках СПЭВ обнаруживается цитопатическое действие в виде очаговой мелкозернистой деструкции монослоя [39, 55]. Следует подчеркнуть, что этот тезис подтвердился в нашем эксперименте по определению чувствительности клеточных линий к инфекции ВКЭ: СПЭВ отличалась массовой

гибелью заражённых клеток (Рисунок 2). Тем не менее, на поздних сроках острой инфекции в клетках свиньи отмечалось специфичное нарастание вирусного антигена (Рисунок 4). В итоге после статистической и аналитической обработки данных не было обнаружено тесной взаимосвязи процессов репликации вирусной +РНК ВКЭ, продукции инфекционного ВКЭ и синтеза вирусного полипротеина в клеточной линии СПЭВ (Таблица 5), что говорит о некотором дисбалансе стадий вирусной репродукции в клетках свиньи.

В результате исследования репродукции ВКЭ в новой перевиваемой линии клеток *A. peninsulae* выявлены несколько особенностей. При моделировании персистентной инфекции была показана способность клеточной линии резервуарного хозяина поддерживать инфекцию ВКЭ на протяжении по меньшей мере 6 месяцев. Все этапы вирусной репродукции проходили с высокой эффективностью (Рисунки 6, 7, 8). Следует отметить, что при длительной инфекции клеточная линия АрпК единственная поддерживала нарастание внеклеточного антигена ВКЭ. При моделировании острой инфекции репродукция ВКЭ в линии клеток АрпК характеризовалась более сглаженной динамикой, по сравнению с референс-моделью СПЭВ, что выражалось в двухступенчатом (в отличие от трёхступенчатого в СПЭВ) подъёме концентрации +РНК ВКЭ (Рисунок 3). Это, вероятно, объясняет замедленный, по сравнению со СПЭВ, процесс формирования инфекционных вирионов. Несмотря на указанную особенность, общая эффективность всех процессов в этой линии клеток оставалась высокой. При сравнении эффективности репродукции ВКЭ в линиях клеток АрпК и МdbК отмечено, что в первой все процессы протекают с большей интенсивностью, чем во второй. Клеточная линия АрпК оказалась более чувствительной к инфекции ВКЭ, чем линия клеток МdbК, и в ней обнаруживались признаки цитопатического ответа (Рисунок 2), но при этом клетки быстро восстанавливались.

В итоговом эксперименте по изучению сбалансированности этапов репродукции ВКЭ обнаружено, что тесная взаимосвязь процессов репликации

вирусной +РНК ВКЭ, продукции инфекционного ВКЭ и синтеза вирусного полипротеина присутствует только в клеточной линии *A. peninsulae* (Таблица 6).

Также в исследовании была продемонстрирована способность новой перевиваемой клеточной линии случайного хозяина *M. sibiricus* поддерживать персистентную инфекцию. На протяжении 6 месяцев в ней выявлялись +РНК ВКЭ и инфекционный вирус в высоких концентрациях, сопоставимых с аналогичными показателями в клеточной линии АрпК (Рисунки 6, 8). Однако эффективного накопления антигена ВКЭ при персистентной инфекции в этой линии клеток не происходило (Рисунок 7). Клеточная линия летучей мыши также поддерживала репродукцию ВКЭ при острой инфекции на уровне репликации вирусной +РНК и продукции инфекционного ВКЭ (Рисунки 3, 5). Изменения количества +РНК ВКЭ в линии клеток MdbK не проявляли ступенчатого характера, в отличие от АрпК и СПЭВ, и выражались в плавном повышении концентрации (Рисунок 3). Это могло указывать либо на хаотичное протекание процесса вирусной репликации без закономерного накапливания новых генераций вирионов, либо на очень низкую скорость этого процесса. Кроме этого, при острой инфекции в клеточной линии сибирской ночницы не было обнаружено антигена ВКЭ (Рисунок 4). В результате нашего исследования предположение о хаотичности протекания этапов репродукции ВКЭ в клеточной линии случайного хозяина подтвердилось. Суммируя данные экспериментов по острой и персистентной инфекции, мы обнаружили, что процессы вирусной репликации, трансляции полипротеина ВКЭ и продукции инфекционного ВКЭ наименее согласованы между собой именно в клеточной линии *M. sibiricus* (Таблица 7). При этом следует отметить, что данная клеточная линия была наименее чувствительна к заражению ВКЭ, поскольку она не показала признаков массовой гибели заражённых клеток (Рисунок 2). Вполне вероятно, что выявленные для линии клеток сибирской ночницы особенности вирусной репродукции обусловлены эволюционной неприспособленностью летучих мышей к инфекции ВКЭ. Следует заметить, что экспериментальная инфекция животных и клеточных моделей летучих мышей клещевыми флавивирусами была показана ранее

в исследованиях К. М. Pavgi и К. R. Singh (2011) и P. Sarkale et al. (2019) [149, 199]. В одной из этих работ была продемонстрирована высокая летальность летучих мышей под влиянием флавивирусной инфекции, а также низкий титр выявляемого в органах вируса или полное его отсутствие [199]. Во второй работе показана низкая перmissивность клеточной линии летучей мыши для инфекции флавивирусов, которое выражалось в низком количестве копий вируса и отсутствии ЦПД [149].

В результате изучения адаптивных изменений, произошедших в геноме ВКЭ в клеточных линиях резервуарного и случайного хозяев в ходе персистентной инфекции, были выявлены мутации в структурных (только для MdbK) и неструктурных (и ArnK, и MdbK) частях вирусного генома (Таблица 10). Есть вероятность, что отмеченные при адаптации к линии клеток *M. sibiricus* изменения в белке Е ВКЭ являются причиной отсутствия в ней вирусного антигена при персистентной инфекции: изменённый белок попросту не детектируется тест-системой. Исходя из возможных функций небольших гидрофобных белков NS4A и NS4B, можно предположить, что замены в них могли сыграть роль в усилении поддержания синтеза вирусной РНК. Это согласуется с полученными результатами по репликации РНК ВКЭ для линий клеток ArnK и MdbK, в которых она протекала с высокой эффективностью на протяжении всего эксперимента (Рисунки 6, 8). В дальнейшем следует выяснить, играет ли роль обнаруженная мутация в белке Е для адсорбции и пенетрации ВКЭ в клетки летучей мыши, а также сравнить эффективность этих процессов с их эффективностью для клеточной линии восточноазиатской лесной мыши, в которой подобной мутации выявлено не было.

Особое внимание обращает на себя тот факт, что ни одна из обнаруженных мутаций не является облигатной для адаптации к той или другой клеточной системе. Например, наиболее специфичная для ВКЭ, персистировавшего в клетках ArnK, мутация E20K в белке NS4B обнаруживается у 3 из 4 эволюционных линий ВКЭ – все остальные мутации встречаются в единичных случаях. В случае с клеточной линией MdbK наблюдается подобная

картина: наиболее специфичная мутация N103I в NS4A встречается у трёх вариантов ВКЭ (М2–М4), тогда как вариант М1 вообще не содержит замен в этом белке. Остальные мутации также встречаются в единичных случаях. Необходимо, однако, отметить, что при адаптации к клеткам АрпК в каждой эволюционной линии ВКЭ происходила по меньшей мере одна мутация в белке Е и одна – в белке NS4В; вдобавок в 50 % случаев появилась замена в белке NS4А. При адаптации к клеткам МdbК в каждой линии ВКЭ возникала одна мутация в белке Е и в 75 % случаев – мутация в белке NS4А. Вероятно, именно эти белки играют ключевую роль в приспособлении ВКЭ к исследуемым клеткам млекопитающих.

Таким образом, созданные перевиваемые клеточные линии *A. peninsulae* и *M. sibiricus* являются новыми инструментами для проведения *in vitro* исследований по изучению жизнедеятельности ВКЭ и других флавивирусов в естественных условиях. Полученные в результате нашей работы данные указывают на то, что новые линии клеток поддерживают вирусную репродукцию как при острой, так и при персистентной инфекции, несмотря то, что сами млекопитающие выполняют разную роль для ВКЭ в природе. Следует отдельно подчеркнуть, что, из трёх исследованных клеточных линий клеточная линия резервуарного хозяина АрпК продемонстрировала наибольшую пермиссивность для репродукции ВКЭ, что обусловлено высокой выживаемостью клеток при цитопатическом действии вируса, высокой продуктивностью и наибольшей согласованностью всех стадий вирусной репродукции, а также способностью к поддержанию персистенции ВКЭ.

ВЫВОДЫ

1. Доказано, что культуры клеток ArnK и MdbK являются адгезивными перевиваемыми линиями клеток, обладают стабильными культуральными характеристиками, принадлежат видам *Apodemus peninsulae* и *Myotis sibiricus* соответственно и могут быть использованы в качестве лабораторных моделей резервуарного (ArnK) и случайного (MdbK) позвоночных хозяев ВКЭ в вирусологических исследованиях.

2. Показано, что при средней множественности инфекции (1 БОЕ на клетку) культура клеток ArnK проявляет выраженный цитопатический ответ на вирусную инфекцию, однако отличается высоким (> 80 %) уровнем выживаемости клеток. Культура клеток MdbK является наименее чувствительной к заражению ВКЭ, цитопатическое действие вируса не выражено, гибели клеток вследствие заражения ВКЭ не происходит.

3. При высокой множественности заражения (10 БОЕ на клетку) в культуре клеток ArnK репродукция ВКЭ происходит более равномерно по сравнению с клеточной линией СПЭВ, что проявляется в сглаженной динамике синтеза внутриклеточной вирусной +РНК, продукции инфекционного вируса и накоплении вирусного антигена в культуральной среде. При этом итоговая эффективность всех процессов остаётся высокой. В культуре клеток MdbK отмечено общее снижение эффективности репродукции ВКЭ, что проявляется как в замедлении синтеза, так и в снижении итогового количества вирусной +РНК, инфекционного вируса и вирусного антигена.

4. При низкой множественности заражения (0,1 БОЕ на клетку) ВКЭ способен персистентно инфицировать линии клеток ArnK и MdbK на протяжении 6 месяцев. При этом динамика синтеза +РНК ВКЭ и динамика продукции инфекционного вируса в ArnK и MdbK сопоставимы, однако продукция вирусного антигена в MdbK многократно ниже, а цитопатическое действие вируса сильнее, чем в ArnK. Продemonстрировано, что ВКЭ не способен

персистентно репродуцироваться в клеточной линии СПЭВ, однако в выживших клетках СПЭВ вирусная +РНК выявляется на протяжении, по меньшей мере, 17 недель после заражения.

5. Установлено, что при адаптации ВКЭ к клеточной линии резервуарного хозяина АрпК наиболее видоспецифичные по клетке-хозяину изменения происходят в белках NS4A и NS4B. При адаптации к клеточной линии случайного хозяина MdbK более характерны замены в белках E и NS4A. Белки C, prM, NS2A и NS2B остаются не вовлечёнными в процесс адаптации ни в одной из исследованных клеточных линий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

3'-НТР	– 3'-нетранслируемый регион генома ВКЭ
5'-НТР	– 5'-нетранслируемый регион генома ВКЭ
ApnK	– перевиваемая культура клеток почки восточноазиатской лесной мыши
BHK-21	– клеточная линия сирийского хомячка
C	– капсидный белок ВКЭ
COI	– ген цитохромоксидазы 1
CytB	– ген цитохрома B
d-loop	– ген D-петли
E	– оболочечный белок ВКЭ
HEK 293T	– клеточная линия почки эмбриона человека
HeLa	– линия клеток раковой опухоли шейки матки человека
LD50	– 50%-я летальная доза
MdbK	– перевиваемая культура клеток почки сибирской ночницы
NGS	– (англ. next generation sequencing) высокопроизводительное секвенирование
NS1	– неструктурный белок ВКЭ NS1
NS2A	– неструктурный белок ВКЭ NS2A
NS2B	– неструктурный белок ВКЭ NS2B
NS3	– неструктурный белок ВКЭ NS3
NS4A	– неструктурный белок ВКЭ NS4A
NS4B	– неструктурный белок ВКЭ NS4B
NS5	– неструктурный белок ВКЭ NS5
(pr)M	– мембранный белок ВКЭ
VEF	– эмбриональные фибробласты <i>M. glareolus</i>
Vero	– линия клеток почки африканской зелёной мартышки
БОЕ	– бляшкообразующая единица

ВКЭ	– вирус клещевого энцефалита
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФН	– интерферон
КВЭ	– клещевой вирусный энцефалит
КЭ	– клещевой энцефалит
МИ	– множественность инфекции
н.о.	– нуклеотидное основание
ОП	– оптическая плотность
ОП _{отр.}	– оптическая плотность отрицательных контрольных образцов
ОП _{пор.}	– пороговый уровень оптической плотности
ОТ	– реакция обратной транскрипции
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
+РНК	– одноцепочечная РНК положительной полярности
–РНК	– одноцепочечная РНК отрицательной полярности
РНК	– рибонуклеиновая кислота
рНТФ	– рибонуклеозидтрифосфат
СПЭВ	– перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи
СФО	– Сибирский федеральный округ
ФСБ	– фосфатно-солевой буферный раствор
ЦПД	– цитопатическое действие
ЭДТА	– этилендиаминтетраацетат
ЭТС	– эмбриональная телячья сыворотка

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, А. Н. Передача вируса клещевого энцефалита иксодовыми клещами в эксперименте (механизмы, сроки, видовые и половые различия) / А. Н. Алексеев, С. П. Чунихин // Паразитология. – 1990. – Т. 24, № 3. – С. 177–185.
2. Алексеев, А. Н. Различия в дистантной передаче вируса клещевого энцефалита иксодовыми клещами двух подсемейств / А. Н. Алексеев, С. П. Чунихин // Паразитология. – 1992. – Вып. 26 (6). – С. 506–515.
3. Алексеев, А. Н. Система «клещ – возбудитель» и ее эмерджентные свойства / А. Н. Алексеев. – СПб. : ЗИН РАН, 1993. – 204 с.
4. Алексеев, А. Н. Функционирование паразитарной системы «клещ – возбудители» в условиях усиливающегося антропогенного пресса / А. Н. Алексеев, Е. В. Дубинина, О. В. Юшкова. – СПб. : Инсанта, 2008. – 146 с.
5. Аммосов, А. Д. Клещевой энцефалит. Информационно-методическое пособие / А. Д. Аммосов. – Кольцово : ЗАО «Вектор-Бест», 2006. – 115 с.
6. Анализ геномов штаммов вируса клещевого энцефалита, обладающих различной вирулентностью для человека / С. И. Беликов, Г. Н. Леонова, И. Г. Кондратов [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – Т. 42, № 3. – С. 23–26.
7. Биологическая и молекулярно-генетическая характеристика дальневосточной популяции вируса клещевого энцефалита и ее патогенетическое значение / Г. Н. Леонова, С. И. Беликов, Е. В. Павленко [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2007. – Т. 52, № 6. – С. 13–17.
8. Борисов, В. А. Клещевой энцефалит / В. А. Борисов, И. В. Малов, Н. Д. Юшук. – Новосибирск : Наука, 2002. – 183 с.
9. Брем, А. Э. Жизнь животных / А. Э. Брем. – М. : ОЛМА-ПРЕСС ; ОАО «Красный пролетарий», 2004. – 1192 с.
10. Взаимоотношения клещей *Ixodes persulcatus* и вируса клещевого энцефалита с красной полевкой (*Clethrionomys rutilus*) в Западной Сибири

/ В. Н. Бахвалова, О. В. Морозова, В. А. Матвеева [и др.] // Паразитология. – 2003. – Т. 37, № 1. – С. 18–30.

11. Виноградов, Б. С. Определитель грызунов. Фауна СССР. Млекопитающие / Б. С. Виноградов, А. И. Аргиропуло. – М. – Л. : Изд-во АН СССР, 1941. – 241 с.

12. Вирус клещевого энцефалита в Монголии / М. А. Хаснатинов, Г. А. Данчинова, В. И. Злобин [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – № 4. – С. 9–12.

13. Вирусы комплекса клещевого энцефалита / Е. Н. Левкович, В. В. Погодина, Г. Д. Засухина [и др.]. – Л. : Медицина, 1967. – 246 с.

14. Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования / Т. В. Демина, Ю. П. Джигоев, И. В. Козлова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2012. – Т. 57, № 4. – С. 13–18.

15. Динамика репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток / О. В. Морозова, А. Е. Гришечкин, В. Н. Бахвалова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2012. – Т. 57, № 2. – С. 40–43.

16. Заболеваемость клещевым вирусным энцефалитом в субъектах Российской Федерации. Сообщение 1: Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в 2018 г. и прогноз на 2019 г. / А. К. Носков, Е. И. Андаев, А. Я. Никитин [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 1. – С. 74–80.

17. Зильбер, Л. А. Весенний (весенне-летний) эпидемический клещевой энцефалит / Л. А. Зильбер // Архив биологических наук. – 1939. – Т. 56, № 2. – С. 9–37.

18. Злобин, В. И. Клещевой энцефалит в Российской Федерации: современное состояние проблемы и стратегия профилактики / В. И. Злобин // Вопросы вирусологии. – 2005. – Вып. 3. – С. 26–31.

19. Злобин, В. И. Клещевой энцефалит в Российской Федерации: этиология, эпидемиология и стратегия профилактики / В. И. Злобин // Terra Medica. – 2010. – Вып. 2 (61). – С. 13–21.

20. Злобин, В. И. Клещевой энцефалит. Этиология, эпидемиология и профилактика в Сибири / В. И. Злобин, О. З. Горин. – Новосибирск : Наука, 1996. – 177 с.
21. Злобин, В. И. Клещевые трансмиссивные инфекции / В. И. Злобин, Н. В. Рудаков, И. В. Малов. – Новосибирск : Наука, 2015. – 224 с.
22. Иерусалимский, А. П. Клещевой энцефалит: руководство для врачей / А. П. Иерусалимский. – Новосибирск, 2001. – С. 6–62.
23. Инфекции, передаваемые клещами в Сибирском регионе / В. В. Власов, В. Е. Репин, Л. М. Банникова [и др.]. – Новосибирск : Издательство СО РАН, 2011. – 397 с.
24. Камалов, И. И. Перспективы разработки живой аттенуированной вакцины против клещевого энцефалита / И. И. Камалов, Е. Д. Соколова, Е. У. Денисова // Клещевой энцефалит. – Л. : Институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 1989. – Вып. 65. – С. 98–120.
25. Клещевой вирусный энцефалит в Российской Федерации: особенности эпидемического процесса в период устойчивого спада заболеваемости, эпидемиологическая ситуация в 2016 г., прогноз на 2017 г. / А. К. Носков, А. Я. Никитин, Е. И. Андаев [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 1. – С. 37–43.
26. Кодированные нуклеотидные последовательности штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных из крови людей без клинических проявлений инфекции / С. И. Беликов, Г. Н. Леонова, И. Г. Кондратов [и др.] // Генетика. – 2010. – Т. 46, № 3. – С. 356–363.
27. Количественная оценка репликации РНК вируса клещевого энцефалита в клетках естественного хозяина *Apodemus peninsulae* / М. А. Хаснатинов, Н. А. Болотова, К. С. Миловидов [и др.] // Национальные приоритеты России. – 2016. – № 4 (22). – С. 108–111.
28. Коренберг, Э. И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в лесной зоне, и стратегия их профилактики: изменение приоритетов

/ Э. И. Коренберг // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – Вып. 5 (72). – С. 7–17.

29. Коренберг, Э. И. Методологические и общебиологические аспекты развития учения о природной очаговости болезней / Э. И. Коренберг // В кн. : Вопросы природной очаговости болезней. – Алма-Ата : Наука, 1986. – Вып. 14. – С. 12–24.

30. Коренберг, Э. И. Природно-очаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами / Э. И. Коренберг, В. Г. Помелова, Н. С. Осин. – М., 2013. – 463 с.

31. Коренберг, Э. И. Современные черты природной очаговости клещевого энцефалита: новые черты или хорошо забытые? / Э. И. Коренберг // Медицинская паразитология. – 2008. – № 3. – С. 3–8.

32. Крылова, Н. В. Особенности цитокинового профиля на ранних стадиях инфицирования вирусом клещевого энцефалита у вакцинированных и невакцинированных людей / Н. В. Крылова, Г. Н. Леонова, Е. В. Павленко // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 78–81.

33. Кучерук, В. В. Количественный учет важнейших теплокровных носителей болезней / В. В. Кучерук, Э. И. Коренберг // Методы изучения природных очагов болезней человека. – М. : Медицина, 1964. – С. 129–153.

34. Ламининовый рецептор человека как клеточный рецептор для вируса клещевого энцефалита / Е. В. Протопопов, А. В. Сорокин, А. В. Качко [и др.] // Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера. – 1998. – С. 13.

35. Леонова, Г. Н. Клещевой энцефалит в Приморском крае / Г. Н. Леонова. – Владивосток : Дальнаука, 1997. – 187 с.

36. Лещинская, Е. В. Вирусные болезни человека. Клиника, распознавание, лечение и профилактика / Е. В. Лещинская. – М. : Медицина, 1967. – С. 211–234.

37. Литвин, В. Ю. Природная очаговость болезней: развитие концепций к исходу века / В. Ю. Литвин, Э. И. Коренберг // Паразитология. – 1999. – Т. 33, № 3. – С. 179–191.

38. Молекулярное типирование штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных от людей с различной тяжестью инфекции на территории юга Дальнего Востока / Г. Н. Леонова, С. И. Беликов, Н. В. Кулакова [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2004. – № 2. – С. 32–37.

39. Морфологическое и цитохимическое изучение действия вируса клещевого энцефалита на клетки тканевых культур / П. Я. Залкинд, О. Г. Анджапаридзе, Н. Н. Богомоллова [и др.] // В кн.: Клещевой энцефалит и другие арбовирусные инфекции; отв. ред. М. П. Чумаков, В. И. Вотяков. – Москва – Минск, 1962. – Р. 58–59.

40. Настоящие ящерицы (Reptilia: Sauria: Lacertidae) – хозяева европейского лесного клеща, *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) (Acari: Parasitiformes: Ixodidae) на Северо-Западном Кавказе / А. Л. Тимошина, К. А. Матушкина, А. А. Кидов [и др.] // Вестн. Тамбов, ун-та. Серия: Естественные и технические науки. – 2013. – Т. 18, № 6-1. – С. 3082–3083.

41. Опыт серологического обследования мелких млекопитающих в природном очаге клещевого энцефалита Средней Сибири / Г. С. Кисленко, Ю. С. Коротков, С. П. Чунихин [и др.] // Медицинская паразитология. – 1993. – № 3. – С. 34–38.

42. Особенности эпидемиологической ситуации по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2017 г. и прогноз ее развития на 2018 г. / А. Я. Никитин, Е. И. Андаев, А. К. Носков [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 1. – С. 44–49.

43. Павловский, Е. Н. О природной очаговости инфекционных и паразитарных болезней / Е. Н. Павловский // Вестник АН СССР. – 1939. – № 10. – С. 98–108.

44. Павловский, Е. Н. Основы учения о природной очаговости трансмиссивных болезней человека / Е. Н. Павловский // Журнал общей биологии. – 1946. – Вып. 7 (1). – С. 3–33.

45. Павловский, Е. Н. Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов / Е. Н. Павловский. – М. – Л. : Наука, 1964. – 211 с.
46. Паразитизм европейского лесного клеща, *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) (Acari, Parasitiformes: Ixodidae) на ящерице Браунера, *Darevskia brauneri* (Mehely, 1909) (Reptilia, Sauria: Lacertidae) / А. А. Кидов, А. Л. Тимошина, К. А. Матушкина [и др.] // Вестник Бурятского государственного университета. – 2013. – Вып. 4. – С. 165–166.
47. Персистенция вируса клещевого энцефалита в организме диких мелких млекопитающих и в культурах пермиссивных клеток / В. Н. Бахвалова, В. В. Панов, О. Ф. Потапова [и др.] // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2007. – Вып. 11. – С. 79–87.
48. Погодина, В. В. Преобразование популяций вируса клещевого энцефалита в условиях антропогенной трансформации природных очагов / В. В. Погодина, Н. М. Колясникова // Тр. Ин-та полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова. – 2008. – Вып. 25. – С. 103–114.
49. Погодина, В. В. Хронический клещевой энцефалит / В. В. Погодина, М. П. Фролова, Б. А. Ерман. – Новосибирск : Наука, 1986. – 78 с.
50. Покровский, В. И. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке / В. И. Покровский, Г. Г. Онищенко, Б. Л. Черкасский. – М. : Медицина, 2003. – 664 с.
51. Половая передача вируса клещевого энцефалита у иксодовых клещей (Ixodidae) / С. П. Чунихин, Л. Ф. Стефуткина, М. Б. Королев [и др.] // Паразитология. – 1983. – Т. 17, Вып. 3. – С. 214–217.
52. Сибирский и дальневосточный подтипы вируса клещевого энцефалита в европейских и азиатских регионах России: генетическая и антигенная характеристика штаммов / В. В. Погодина, Н. Г. Бочкова, Л. С. Карань [и др.] // Вопросы вирусологии – 2004. – № 4. – С. 20–25.
53. Смородинцев, А. А. Клещевой энцефалит и его вакцинопрофилактика / А. А. Смородинцев, А. В. Дубов. – Л. : Медицина, 1986. – 232 с.

54. Современные подходы к изучению клещевых трансмиссивных инфекций в Кузбассе на основе молекулярных методов / Н. В. Рудаков, С. А. Рудакова, А. Р. Ефимова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 26–28.

55. Соловьев, В. Д. Очерки по вирусной цитопатологии / В. Д. Соловьев, Я. Е. Хесин, А. Ф. Быковский. – М. : Медицина, 1979. – 320 с.

56. Сравнительный анализ геномов штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных от комаров и клещей / Н. М. Пуховская, О. В. Морозова, Н. Б. Белозерова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62, № 1. – С. 30–35.

57. Трансмиссивные вирусные инфекции Западной Сибири (региональные аспекты эпидемиологии, экологии возбудителей и вопросы микроэволюции) / В. В. Якименко, М. Г. Малькова, Ж. С. Тюлько [и др.]. – Омск : Издательский центр КАН, 2019. – 312 с.

58. Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Об итогах сезона клещевых инфекций [Электронный ресурс]. – 2020. – Режим доступа: <http://38.rospotrebnadzor.ru/news>.

59. Фауна и экология популяций иксодовых клещей - переносчиков клещевых инфекций в Прибайкалье / Г. А. Данчинова, М. А. Хаснатинов, С. С. Шулунов [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. – 2007. – Т. 55, № S3. – С. 86–89.

60. Филиппова, Н. А. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (*Acarina, Ixodidae*): морфология, систематика, экология, медицинское значение / Н. А. Филиппова. – Л. : Наука, 1985. – С. 97–187.

61. Цитокины и антитела при экспериментальном заражении диких и лабораторных грызунов (Rodentia) вирусом клещевого энцефалита / В. Н. Бахвалова, В. В. Панов, О. Ф. Потапова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62, № 4. – С. 186–192.

62. Чернохаева, Л. Л. Современный ареал клещевого энцефалита в Российской Федерации / Л. Л. Чернохаева, И. С. Холодилов, Н. Д. Пакскина // Тр. Ин-та полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова. – 2016. – Вып. 1 (30). – С. 6–22.

63. Чумаков, М. П. Клещевой весенне-летний энцефалит в европейской части СССР и Западной Сибири / М. П. Чумаков // Зоологический журнал. – 1940. – Т. 19, № 2. – С. 335.
64. Чунихин, С. П. Экология и географическое распространение арбовирусов / С. П. Чунихин, Г. Н. Леонова. – М. : Медицина, 1985. – 125 с.
65. Шалаева, Н. М. Экологические особенности гельминтофауны азиатской лесной мыши (*Apodemus peninsulae*, Thom, 1862) в Забайкалье / Н. М. Шалаева // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2016. – № 17. – С. 508–509.
66. Эколого-паразитологическая характеристика совмещенных очагов инфекций, передаваемых клещами, на территории проведения саммита АТЭС (2012 г.) / С. В. Балахонов, А. Я. Никитин, Е. И. Андаев [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 111, № 4. – С. 67–71.
67. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в приграничных субъектах Российской Федерации и на сопредельных территориях стран в 2000–2017 гг.: аналитический обзор / Е. И. Андаев, Ю. Н. Трушина, А. Я. Никитин [и др.] ; под ред. С. В. Балахонова. – Иркутск : ИНЦХТ, 2020. – 96 с.
68. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2015 и прогноз на 2016 год / А. Я. Никитин, А. К. Носков, Е. И. Андаев [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 1. – С. 40–43.
69. Эпидемиология. Противоэпидемические мероприятия в очагах инфекционных болезней: учебное пособие / Г. Н. Чистенко, А. М. Близнюк, М. И. Бендацкая [и др.]. – Минск : Новое знание, 2007. – С. 6–33.
70. Этиология весенне-летнего энцефалита / Л. А. Зильбер, Е. Н. Левкович, А. К. Шубладзе [и др.] // Архив биологических наук. – 1938. – Т. 52. – С. 162–182.
71. Якименко, В. В. Иксодовые клещи Западной Сибири: фауна, экология, основные методы исследования / В. В. Якименко. – Омск : ООО ИЦ «Омский научный вестник», 2013. – 240 с.

72. «886-84-like» tick-borne encephalitis virus strains: Intraspecific status elucidated by comparative genomics / R. V. Adelshin, E. A. Sidorova, A. N. Bondaryuk [et al.] // Ticks Tick Borne Dis. – 2019. – Vol. 10 (5). – P. 1168–1172.
73. A BHK-21 cell culture-adapted tick-borne encephalitis virus mutant is attenuated for neuroinvasiveness / A. Goto, D. Hayasaka, K. Yoshii [et al.] // Vaccine. – 2003. – Vol. 21 (25-26). – P. 4043–4051.
74. A cluster of two human cases of tick-borne encephalitis (TBE) transmitted by unpasteurised goat milk and cheese in Germany, May 2016 / S. O. Brockmann, R. Oehme, T. Buckenmaier [et al.] // Euro Surveill. – 2018. – Vol. 23 (15). – P. 17-00336. – doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.15.17-00336.
75. A model system for *in vitro* studies of bank vole borne viruses / M. Stoltz, K. B. Sundström, Å. Hidmark [et al.] // PLoS One. – 2011. – Vol. 6 (12). – P. e28992. – doi: 10.1371/journal.pone.0028992.
76. A new permanent cell line derived from the bank vole (*Myodes glareolus*) as cell culture model for zoonotic viruses / S. S. Essbauer, E. Krautkrämer, S. Herzog [et al.] // Virology Journal. – 2011. – Vol. 8 (1). – P. 339. – doi: 10.1186/1743-422X-8-339.
77. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China / X. Dai, G. Shang, S. Lu [et al.] // Emerg. Microbes Infect. – 2018. – Vol. 7 (1). – P. 74. – doi: 10.1038/s41426-018-0081-6.
78. A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host / L. D. Jones, C. R. Davies, G. M. Steele [et al.] // Science. – 1987. – Vol. 237. – P. 775–777.
79. A spatial aspect on mitochondrial DNA genealogy in *Apodemus peninsulae* from East Asia / K. Serizawa, H. Suzuki, M. A. Iwasa [et al.] // Biochem. Genet. – 2002. – Vol. 40 (5-6). – P. 149–161.
80. A three-dimensional comparison of tick-borne flavivirus infection in mammalian and tick cell lines / D. K. Offerdahl, D. W. Dorward, B. T. Hansen [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7 (10). – P. e47912. – doi: 10.1371/journal.pone.0047912.

81. Adaptation of tick-borne encephalitis virus from human brain to different cell cultures induces multiple genomic substitutions / E. P. Ponomareva, V. A. Ternovoi, T. P. Mikryukova [et al.] // Arch. Virol. – 2017. – Vol. 162 (10). – P. 3151–3156.
82. 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* / C. W. Mandl, H. Kroschewski, S. L. Allison [et al.] // J. Virol. – 2001. – Vol. 75 (12). – P. 5627–5637.
83. Albrecht, P. Study of tick-borne encephalitis infection in chick embryos / P. Albrecht // Acta Virol. – 1960. – Vol. 4. – P. 150–159.
84. Alekseev, A. N. The experimental transmission of the tick-borne encephalitis virus by Ixodid ticks (the mechanisms, time periods, species and sex differences) / A. N. Alekseev, S. P. Chunikhin // Parazitologiya. – 1990. – Vol. 24 (3). – P. 177–185.
85. Bakhvalova, V. N. Tick-borne encephalitis virus quasispecies rearrangements in ticks and mammals / V. N. Bakhvalova, V. V. Panov, O. V. Morozova // In : Flavivirus encephalitis. – 2011. – P. 213–234.
86. Bat airway epithelial cells: a novel tool for the study of zoonotic viruses / I. Eckerle, L. Ehlen, R. Kallies [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9 (1). – P. e84679. – doi: 10.1371/journal.pone.0084679.
87. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses / C. H. Calisher, J. E. Childs, H. E. Field [et al.] // Clin. Microbiol. Rev. – 2006. – Vol. 19 (3). – P. 531–45.
88. Bauwens, D. The lizards *Lacerta agilis* and *L. vivipara* as hosts to larvae and nymphs of the tick *Ixodes ricinus* / D. Bauwens, H. Strijbosch, A. H. P. Stumpel // Ecography. – 1983. – Vol. 6 (1). – P. 32–40.
89. Beasley, S. J. Threshold problems in infection in *Ixodes ricinus* with the virus of louping-ill / S. J. Beasley, J. A. Campbell, H. W. Reid // In : Tick-borne diseases and their vectors. – 1978. – P. 497–500.
90. Bell-Sakyi, L. Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* / L. Bell-Sakyi // J. Parasitol. – 1991. – Vol. 77 (6). – P. 1006–1008.

91. Biology of *Dermacentor silvarum* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions / J. Z. Liu, Z. N. Liu, Y. Zhang [et al.] // Exp. Appl. Acarol. – 2005. – Vol. 36. – P. 131–138.
92. Blaskovic, D. The ecological approach to the study of tick-borne encephalitis / D. Blaskovic, J. Nosek // Prog. Med. Virol. – 1972. – Vol. 14. – P. 275–320.
93. Blaskovic, D. The public health importance of tick-borne encephalitis in Europe / D. Blaskovic // Bull. Wld Hlth Org. – 1967. – Vol. 36 (Suppl. 1). – P. 5–13.
94. Carter, J. B. Virology: principles and applications / J. B. Carter, V. A. Saunders // School of Biomolecular Sciences. – 2007. – 358 p.
95. CD8⁺ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis / D. Růžek, J. Salát, M. Palus [et al.] // Virology. – 2009. – Vol. 384 (1). – P. 1–6.
96. Change in phenotype of tick-borne encephalitis virus following passage in *Ixodes ricinus* ticks and associated amino acid substitution in the envelope protein / M. Labuda, W. R. Jiang, M. Kaluzova [et al.] // Virus Res. – 1994. – Vol. 31. – P. 305–315.
97. Characterization and complete genome sequences of high- and low-virulence variants of tick-borne encephalitis virus / G. Wallner, C. W. Mandl, M. Ecker [et al.] // J. Gen Virol. – 1996. – Vol. 77. – P. 1035–1042.
98. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis / T. S. Gritsun, T. V. Frolova, A. I. Zhankov [et al.] // J. Virol. – 2003. – Vol. 77. – P. 25–36.
99. Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice / H. Holzmann, K. Stiasny, M. Ecker [et al.] // J. Gen. Virol. – 1997. – Vol. 78. – P. 31–37.
100. Charlier, N. Mouse and hamster models for the study of therapy against *Flavivirus* infections / N. Charlier, E. D. Clercq, J. Neyts // New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases. – 2006. – Vol. 277. – P. 218–229.
101. Chu, P. W. Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication / P. W. Chu, E. G. Westaway // Virology. – 1985. – Vol. 140 (1). – P. 68–79.

102. Chung, C. T. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution / C. T. Chung, S. I. Niemela, R. H. Miller // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 86 (7). – P. 2172–2175.
103. Compounds based on 5-(perylene-3-ylethynyl)uracil scaffold: High activity against tick-borne encephalitis virus and non-specific activity against enterovirus A / A. A. Chistov, A. A. Orlov, P. P. Streshnev [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 171. – P. 93–103.
104. 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 / G. N. Leonova, S. I. Belikov, I. G. Kondratov [et al.] // *Virology*. – 2013. – Vol. 443 (1). – P. 89–98.
105. Danielova, V. Transovarial transmission rates of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks / V. Danielova, J. Holubova // In : *Modern acarology*. – 1991. – Vol. 2. – P. 7–10.
106. DBatVir: the database of bat-associated viruses / L. Chen, B. Liu, J. Yang [et al.] // *Database*. – 2014. – Vol. 2014. – bau021. – doi: 10.1093/database/bau021.
107. Determinants of tick-borne encephalitis virus antibody presence in roe deer (*Capreolus capreolus*) sera / C. Kiffner, T. Vor, P. Hagedorn [et al.] // *Med. Vet. Entomol.* – 2012. – Vol. 26. – P. 18–25.
108. Development and testing of a new tick-borne encephalitis virus vaccine candidate for veterinary use / J. Salát, P. Formanová, M. Huňady [et al.] // *Vaccine*. – 2018. – Vol. 36 (48). – P. 7257–7261.
109. Development of a model system for tick-borne flavivirus persistence in HEK 293T cells / L. Mlera, D. K. Offerdahl, C. Martens [et al.] // *mBio*. – 2015. – Vol. 6 (3). – e00614. – doi: 10.1128/mbio.00614-15.
110. Diagnostic potential and antigenic properties of recombinant tick-borne encephalitis virus subviral particles expressed in mammalian cells from Semliki forest virus replicons / L. Levanov, S. Kuivanen, A. Matveev [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2013. – Vol. 52 (3). – P. 814–822.

111. Dobler, G. Zoonotic tick-borne flaviviruses / G. Dobler // Veterinary Microbiology. – 2010. – Vol. 140 (3-4). – P. 221–228.
112. Dumpis, U. Tick-borne encephalitis / U. Dumpis, D. Crook, J. Oksi // Clin. Infect. Dis. – 1999. – Vol. 28 (4). – P. 882–890.
113. Eckerle, I. More novel hantaviruses and diversifying reservoir hosts-time for development of reservoir-derived cell culture models? / I. Eckerle, M. Lenk, R. G. Ulrich // Viruses. – 2014. – Vol. 6 (3). – P. 951–967.
114. Ectoparasite fauna of the Siberian bat *Myotis sibiricus* (Chiroptera: Vespertilionidae) with a revision of previous data on ectoparasites from Brandt's bat *Myotis brandtii* s. l. and the whiskered bat *M. mystacinus* s. l. of the Eastern Palaearctic / M. V. Orlova, D. V. Kazakov, L. B. Kravchenko [et al.] // Entomological Review. – 2017. – Vol. 97 (8). – P. 1166–1173.
115. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks / M. Labuda, L. D. Jones, T. Williams [et al.] // J. Med. Entomology. – 1993. – Vol. 30 (1). – P. 295–299.
116. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts / M. Labuda, L. D. Jones, T. Williams [et al.] // Med. Vet. Entomology. – 1993. – Vol. 7. – P. 193–196.
117. Epidemiology of a tick-borne viral infection: theoretical insights and practical implications for public health / M. P. Moshkin, E. A. Novikov, S. E. Tkachev [et al.] // Bioessays. – 2009. – Vol. 31 (6) – P. 620–628.
118. Epidemiology, pathogenesis, and control of a tick-borne disease – Kyasanur forest disease: current status and future directions / S. Z. Shah, B. Jabbar, N. Ahmed [et al.] // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2018. – Vol. 8. – P. 149. – doi: 10.3389/fcimb.2018.00149.
119. Ernek, E. The distribution of antibodies against tick-borne encephalitis virus in domestic animals in Tribec Region / E. Ernek, O. Kozuch, M. Gresiková // Bull. Wld Hlth Org. – 1967. – Vol. 36 (Suppl. 1). – P. 73–80.

120. Establishment and characterization of a cell line derived from *Eptesicus nilssonii* / M. Horie, T. Akasaka, S. Matsuda [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 2016. – Vol. 78 (11). – P. 1727–1729.

121. Establishment, characterization, and toxicological application of a spontaneous immortalized cell line from the striped field mouse, *Apodemus agrarius* / J. M. Lee, B.-H. Lee, S.-N. Chang [et al.] // *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* – 2018. – Vol. 54 (10). – P. 779–787.

122. Establishment, immortalisation and characterisation of pteropid bat cell lines / G. Crameri, S. Todd, S. Grimley [et al.] // PLoS One. – 2009. – Vol. 4 (12). – P. e8266. – doi: 10.1371/journal.pone.0008266.

123. Establishment of a laboratory colony of taiga tick *Ixodes persulcatus* for tick-borne pathogen transmission studies / S. Konnai, Y. Saito, H. Nishikado [et al.] // Jpn. J. Vet. Res. – 2008. – Vol. 55. – P. 85–92.

124. Establishment of cell line from embryonic tissue of *Pipistrellus ceylonicus* bat species from India & its susceptibility to different viruses / D. T. Mourya, R. J. Lakra, P. D. Yadav [et al.] // Indian J. Med. Res. – 2013. – Vol. 138. – P. 224–231.

125. Establishment of immortalized primary cell from the critically endangered Bonin flying fox (*Pteropus pselaphon*) / T. Tani, T. Eitsuka, M. Katayama [et al.] // PLoS One. – 2019. – Vol. 14 (8). – P. e0221364. – doi: 10.1371/journal.pone.0221364.

126. Establishment of *Myotis myotis* cell lines – model for investigation of host-pathogen interaction in a natural host for emerging viruses / X. He, T. Korytář, Y. Zhu [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9 (10). – P. e109795. – doi: 10.1371/journal.pone.0109795.

127. Estrada-Peña, A. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases / A. Estrada-Peña, J. de la Fuente // Antiviral Research. – 2014. – Vol. 108. – P. 104–128.

128. Evaluation of the population heterogeneity of TBEV laboratory variants using high-throughput sequencing / A. G. Litov, A. A. Deviatkin, I. A. Goptar [et al.] // J. Gen. Virol. – 2018. – Vol. 99 (2). – P. 240–245.

129. Experimental characteristics of viraemia caused by two strains of tick-borne encephalitis virus in small rodents / O. Kozuch, S. P. Chunikhin, M. Gresíková [et al.] // *Acta Virologica*. – 1981. – Vol. 25. – P. 219–224.
130. Experimental encephalitis in monkeys caused by the Powassan virus / M. P. Frolova, L. M. Isachkova, N. M. Shestopalova [et al.] // *Neurosci Behav. Physiol.* – 1985. – Vol. 15. – P. 62–69.
131. Experimental infection of *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis* with tick-borne encephalitis virus / E. Ernek, O. Kozuch, M. Lichard [et al.] // *Acta Virol.* – 1963. – Vol. 7. – P. 434–436.
132. Experimentelle Untersuchungen von klinischen und subklinischen Formen der Zeckenencephalitis an unterschiedlich empfänglichen Wirten: Mäusen, Hamstern und Affen / J. Simon, D. Slonim, H. Zavadova // *Acta Neuropathol.* – 1966. – Vol. 7. – P. 70–78.
133. Exploring the reservoir hosts of tick-borne encephalitis virus / A. Michelitsch, K. Wernike, C. Klaus [et al.] // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11 (7). – P. 669. – doi: 10.3390/v11070669.
134. Fagre, A. C. Can bats serve as reservoirs for arboviruses? / A. C. Fagre, R. C. Kading // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11 (3). – P. 215. – doi: 10.3390/v11030215.
135. Forest structure and roe deer abundance predict tick-borne encephalitis risk in Italy / A. Rizzoli, H. C. Hauffe, V. Tagliapietra [et al.] // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4 (2). – P. e4336. – doi: 10.1371/journal.pone.0004336.
136. Gargili, A. Influence of laboratory animal hosts on the life cycle of *Hyalomma marginatum* and implications for an in vivo transmission model for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus / A. Gargili, S. Thangamani, D. Bente // *Front. Cell Infect. Microbiol.* – 2013. – Vol. 3. – P. 39. – doi: 10.3389/fcimb.2013.00039.
137. Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America / S. P. Morzunov, J. E. Rowe, T. G. Ksiazek [et al.] // *J. Virol.* – 1998. – Vol. 72 (1). – P. 57–64.

138. Genetic characteristics of the causative agent of tick-borne encephalitis in Mongolia / M. A. Khasnatinov, G. A. Danchinova, N. V. Kulakova [et al.] // *Vopr. Virusol.* – 2010. – Vol. 55 (3). – P. 27–32.
139. Gilbert, L. Louping ill virus in the UK: a review of the hosts, transmission and ecological consequences of control / L. Gilbert // *Experimental and Applied Acarology.* – 2015. – Vol. 68 (3). – P. 363–374.
140. Goats and sheep as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) virus – Epidemiological studies in areas endemic and non-endemic for TBE virus in Germany / C. Klaus, M. Beer, R. Saier [et al.] // *Ticks Tick-Borne Dis.* – 2012. – Vol. 3. – P. 27–37.
141. Gong, M. Primary culture and purification of cerebral astrocyte of tree shrew / M. Gong, S. Q. Li, F. Li // *Sheng Li Xue Bao (Acta Phys. Sinica).* – 2011. – Vol. 63 (1). – P. 89–92.
142. Gould, E. Pathogenic flaviviruses / E. Gould, T. Solomon // *Lancet.* – 2008. – Vol. 371 (9611). – P. 500–509.
143. Gould, E. A. Growth, titration and purification of togaviruses / E. A. Gould, J. C. S. Clegg // In : Mahy B. W. J. (ed.). *Virology: A practical approach.* – 1985. – P. 43–48.
144. Gresikova, M. Persistence of tick-borne encephalitis virus infection in milk and milk products / M. Gresikova // *Cs Epidem Mikrobiol Immunol.* – 1959. – Vol. 8. – P. 26–32.
145. Gresikova, M. Secretion of tick-borne encephalitis virus in goat milk / M. Gresikova // *Veter Cas.* – 1957. – Vol. 5. – P. 177–182.
146. Gresikova-Kohutova, M. Experimental pathogenicity of the tick-borne encephalitis virus for the green lizard, *Lacerta viridis* (Laurenti 1768) / M. Gresikova-Kohutova, P. Albrecht // *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* – 1959. – Vol. 3. – P. 258–1.
147. Gritsun, T. S. Tick-borne encephalitis / T. S. Gritsun, V. A. Lashkevich, E. A. Gould // *Antiviral Res.* – 2003. – Vol. 57. – P. 129–146.

148. Gritsun, T. S. Tick-borne flaviviruses / T. S. Gritsun, P. A. Nuttall, E. A. Gould // *Adv. Virus Res.* – 2003. – Vol. 61. – P. 317–371.
149. Growth kinetics of kyasanur forest disease virus in mammalian cell lines and development of plaque reduction neutralization test / P. Sarkale, A. Shrivastava, S. Mohandas [et al.] // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* – 2019. – Vol. 19 (8). – P. 630–636.
150. Growth of tick-borne encephalitis virus (European subtype) in cell lines from vector and non-vector ticks / D. Ružek, L. Bell-Sakyi, J. Kopecký [et al.] // *Virus Research.* – 2008. – Vol. 137 (1). – P. 142–146.
151. Hadi, U. K. Fecundity, oviposition and egg incubation period of female *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae) ticks in Indonesia / U. K. Hadi, M. Adventini // *J. Vet. Med. Res.* – 2015. – Vol. 2. – P. 1036–1039.
152. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. A. Hall // *Nucl. Acids. Symp.* – 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.
153. Havlik, O. The demonstration of antibodies against the virus of the tick-borne encephalitis in certain bats / O. Havlik, J. Kolman // *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* – 1957. – Vol. 1. – P. 231–233.
154. Heigl, Z. Experimental infection with tick-borne encephalitis virus in *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus* / Z. Heigl, G. von Zeipel // *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* – 1966. – Vol. 66. – P. 489–509.
155. Herzig, R. An uncommon severe clinical course of European tick-borne encephalitis / R. Herzig, C. M. Patt, T. Prokes // *Biomed. Papers.* – 2002. – Vol. 146 (2). – P. 63–67.
156. *In vitro* and *in vivo* models for studying Zika virus biology / L. J. Pena, K. S. Guarines, A. J. D. Silva [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2018. – Vol. 99. – P. 1529–1550.
157. *In vivo* characterization of tick-borne encephalitis virus in bank voles (*Myodes glareolus*) / A. Michelitsch, B. A. Tews, C. Klaus [et al.] // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11 (11). – P. 1069. – doi: 10.3390/v11111069.

158. Infection of *Macaca radiata* with viruses of the tick-borne encephalitis group / R. H. Kenyon, M. K. Rippey, K. T. McKee Jr. [et al.] // Microb. Pathog. – 1992. – Vol. 13. – P. 399–409.
159. Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr / C. W. Mandl, M. Ecker, H. Holzmann [et al.] // J. Gen. Virol. – 1997. – Vol. 78 (Pt 5). – P. 1049–1057.
160. Inflammatory response in human tick-borne encephalitis: analysis of postmortem brain tissue / E. Gelpi, M. Preusser, U. Laggner [et al.] // J. Neurovirol. – 2006. – Vol. 12 (4). – P. 322–327.
161. Innate and adaptive immune responses to tick-borne flavivirus infection in sheep / K. L. Mansfield, N. Johnson, A. C. Banyard [et al.] // Vet. Microbiol. – 2016. – Vol. 185. – P. 20–28.
162. Investigating tick-borne flaviviral-like particles as a delivery system for gene therapy / A. H. Neddermeyer, K. Hultenby, M. Paidikondala [et al.] // Curr. Ther. Res. – 2018. – Vol. 88. – P. 8–17.
163. Investigation of relationships between temperature and developmental rates of tick *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in the laboratory and field / N. H. Ogden, L. R. Lindsay, G. Beauchamp [et al.] // J. Med. Entomol. – 2004. – Vol. 41. – P. 622–633.
164. Investigation on the endemic foci of new emerged tick-borne encephalitis in Charles Hilary, Xinjiang / G. L. Zhang, R. Liu, X. Sun [et al.] // Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. – 2013. – Vol. 34 (5). – P. 438–442.
165. Irwin, D. M. Evolution of the cytochrome B gene of mammals / D. M. Irwin, T. D. Kocher, A. C. Wilson // J. Mol. Evol. – 1991. – Vol. 32 (2). – P. 128–144.
166. Isolation of Hokkaido virus, genus Hantavirus, using a newly established cell line derived from the kidney of the grey red-backed vole (*Myodes rufocanus bedfordiae*) / T. Sanada, T. Seto, Y. Ozaki [et al.] // J. Gen. Virol. – 2012. – Vol. 93 (Pt 10). – P. 2237–2246.

167. Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea / S.-Y. Kim, S.-M. Yun, M. G. Han [et al.] // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2008. – Vol. 8 (1). – P. 7–14.
168. Issues in public health entomology / A. Spielman, R. J. Pollack, E. Kiszewski [et al.] // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2001. – Vol. 1. – P. 3–19.
169. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health / A. Rizzoli, C. Silaghi, A. Obiegala [et al.] // Front. Public Health. – 2014. – Vol. 2. – P. 251. – doi: 10.3389/fpubh.2014.00251.
170. *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* tick cell lines respond to infection with tick-borne encephalitis virus: transcriptomic and proteomic analysis / S. Weisheit, M. Villar, H. Tykalová [et al.] // Parasites & Vectors. – 2015. – Vol. 8 (1). – P. 599. – doi: 10.1186/s13071-015-1210-x.
171. Jones, L. D. Feeding site modification by tick saliva resulting in enhanced virus transmission / L. D. Jones, W. R. Kaufman, P. A. Nuttall // Experientia. – 1992. – Vol. 48. – P. 779–782.
172. Jones, L. D. Non-viraemic transmission of Thogoto virus: influence of time and distance / L. D. Jones, P. A. Nuttall // Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1989. – Vol. 83. – P. 712–714.
173. Knap, N. Correlation of TBE incidence with red deer and roe deer abundance in Slovenia / N. Knap, T. Avšič-Županc // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – e66380. – doi: 10.1371/journal.pone.0066380.
174. Knap, N. Factors affecting the ecology of tick-borne encephalitis in Slovenia / N. Knap, T. Avšič-Županc // Epidemiology and Infection. – 2015. – Vol. 143 (10). – P. 2059–2067.
175. Kolonin, G. V. Fauna of Ixodid ticks of the world (Acari, Ixodidae) [Электронный ресурс] / G. V. Kolonin. – 2009. – Режим доступа: <http://web.archive.org/web/20100922170628/http://www.kolonin.org/3.html>.

176. Kopecky, J. Interaction of virulent and attenuated tick-borne encephalitis virus strains in ticks and a tick cell line / J. Kopecky, I. Stankova // *Folia Parasitol. (Praha)*. – 1998. – Vol. 45. – P. 245–250.
177. Korenberg, E. I. Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia / E. I. Korenberg, Y. V. Kovalevskii // *Zent. Bakterirol.* – 1999. – Vol. 289. – P. 525–539.
178. Kříž, B. Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997–2008) / B. Kříž, C. Benes, M. Daniel // *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* – 2009. – Vol. 58. – P. 98–103.
179. Labuda, M. Survival strategy of tick-borne encephalitis virus: cellular basis and environmental determinants / M. Labuda, S. E. Randolph // *Zentralbl. Bakterirol.* – 1999. – Vol. 289 (5-7). – P. 513–524.
180. Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM / H. Li // *arXiv.org > q-bio > arXiv*. – 2013. – 1303.3997.
181. Lindquist, L. Tick-borne encephalitis / L. Lindquist, O. Vapalahti // *Lancet*. – 2008. – Vol. 371. – P. 1861–1871.
182. Madder, M. Inheritance of weight in *Rhipicephalus appendiculatus* ticks (Acari: Ixodidae) in the laboratory / M. Madder, G. Torreele, D. Berkvens // *Exp. Appl. Acarol.* – 1996. – Vol. 20. – P. 659–665.
183. Mandl, C. W. Presence of poly (A) in a flavivirus: significant differences between the 3'-noncoding regions of the genomic RNAs of tick-borne encephalitis virus strains / C. W. Mandl, C. Kunz, F. X. Heinz // *J. Virol.* – 1991. – Vol. 65. – P. 4070–4077.
184. Mandl, C. W. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis / C. W. Mandl // *Virus Research*. – 2005. – Vol. 111 (2). – P. 161–174.
185. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2018. – Vol. 35. – P. 1547–1549.

186. Mihalca, A. D. The role of rodents in the ecology of *Ixodes ricinus* and associated pathogens in Central and Eastern Europe / A. D. Mihalca, A. D. Sándor // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2013. – Vol. 3. – P. 56. – doi: 10.3389/fcimb.2013.00056.

187. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Lithuania / X. Han, A. Juceviciene, N. Y. Uzcategui [et al.] // J. Med. Virol. – 2005. – Vol. 7 (2). – P. 249–256.

188. Moreira-Soto, A. Neotropical primary bat cell lines show restricted dengue virus replication / A. Moreira-Soto, C. Soto-Garita, E. Corrales-Aguilar // Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. – 2017. – Vol. 50. – P. 101–105.

189. Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of Western Siberia, Russia / V. N. Bakhvalova, A. K. Dobrotvorsky, V. V. Panov [et al.] // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2006. – Vol. 6. – P. 32–41.

190. New genetic lineage within the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus found in Western Siberia, Russia / S. E. Tkachev, G. S. Chicherina, I. Golovljova [et al.] // Infect. Genet. Evol. – 2017. – Vol. 56. – P. 36–43.

191. Nonstructural protein 1 of tick-borne encephalitis virus induces oxidative stress and activates antioxidant defense by the NRF2/ARE pathway / Y. V. Kuzmenko, O. A. Smirnova, A. V. Ivanov [et al.] // Intervirology. – 2016. – Vol. 59 (2). – P. 111–117.

192. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature / M. Labuda, P. A. Nuttall, O. Kožuch [et al.] // Experientia. – 1993. – Vol. 49 (9). – P. 802–805.

193. Nosek, J. Persistence of tick-borne encephalitis virus in hibernating bats / J. Nosek, M. Gresikova, J. Rehacek // Acta Virologica. – 1961. – Vol. 5 (2). – P. 112–116.

194. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope gene of the Vasilchenko strain of TBE virus; comparison with other flaviviruses

/ T. S. Gritsun, T. V. Frolova, V. V. Pogodina [et al.] // Virus Research. – 1993. – Vol. 27. – P. 201–209.

195. Nuttall, P. A. Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface / P. A. Nuttall, M. Labuda // Adv. Virus Res. – 2003. – Vol. 60. – P. 233–272.

196. Nuttall, P. A. Tick-borne encephalitis / P. A. Nuttall, M. Labuda // In : Tick-Borne Diseases of Humans. – 2005. – P. 150–163.

197. Outbreak of alimentary tick-borne encephalitis in Podlaskie voivodeship, Poland / M. E. Król, B. Borawski, A. Nowicka-Ciełuszecka [et al.] // Przegl. Epidemiol. – 2019. – Vol. 73 (2). – P. 239–248.

198. Patterns of tick-borne encephalitis virus infection in rodents in Slovenia / N. Knap, M. Korva, V. Dolinšek [et al.] // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2012. – Vol. 12. – P. 236–242.

199. Pavri, K. M. Kyasanur forest disease virus infection in the frugivorous bat, *Cynopterus sphinx* / K. M. Pavri, K. R. Singh // Indian J. Med. Res. – 1968. – Vol. 56 (8). – P. 1202–1204.

200. Persistence of tick-borne encephalitis virus in monkeys. III. Phenotypes of the persisting virus / V. V. Pogodina, L. S. Levina, G. I. Fokina [et al.] // Acta Virol. – 1981. – Vol. 25. – P. 352–360.

201. Pfeffer, M. Tick-borne encephalitis virus in dogs – is this an issue? / M. Pfeffer, G. Dobler // Parasit. Vectors. – 2011. – Vol. 4. – P. 59. – doi: 10.1186/1756-3305-4-59.

202. Poponnikova, T. V. Specific clinical and epidemiological features of tick-borne encephalitis in Western Siberia / T. V. Poponnikova // Int. J. Med. Microbiol. – 2006. – Vol. 296 (Suppl. 40). – P. 59–62.

203. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies / P. M. Zanotto, E. A. Gould, G. F. Gao [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1996. – Vol. 93 (2). – P. 548–553.

204. Preclinical investigations of the safety, immunogenicity and efficacy of a purified, inactivated tick-borne encephalitis vaccine / U. Klockmann, H. L. Bock, V. Franke [et al.] // J. Biol. Stand. – 1989. – Vol. 17 (4). – P. 331–342.

205. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland / E. Cisak, A. Wójcik-Fatla, V. Zajac [et al.] // *Ann. Agric. Environ. Med.* – 2010. – Vol. 17. – P. 283–286.

206. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from the Lublin region (Eastern Poland) / A. Wójcik-Fatla, E. Cisak, V. Zajac [et al.] // *Ticks Tick-Borne Dis.* – 2011. – Vol. 2 (1). – P. 16–19.

207. Probability & statistics for engineers & scientists ; 8th ed. / R. E. Walpole, R. H. Myers, S. L. Myers [et al.]. – Upper Saddle River : Pearson Education, 2007. – 791 p.

208. Radda, A. Threshold of viraemia in *Apodemus flavicollis* for infection of *Ixodes ricinus* with tick-borne encephalitis virus / A. Radda, H. Hofmann, G. Pretzmann // *Acta Virol.* – 1969. – Vol. 13 (1). – P. 74–77.

209. Rajagopalan, P. K. Isolation of Kyasanur Forest disease virus from the insectivorous bat, *Rhinolophus rouxi* and from *Ornithodoros* ticks / P. K. Rajagopalan, S. D. Paul, M. A. Sreenivasan // *Indian J. Med. Res.* – 1969. – Vol. 57 (5). – P. 805–808.

210. Randolph, S. E. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission / S. E. Randolph, L. Gern, P. A. Nuttall // *Parasitol. Today.* – 1996. – Vol. 12. – P. 472–479.

211. Randolph, S. E. Predicting the risk of tick-borne diseases / S. E. Randolph // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2002. – Vol. 291 (Suppl. 33). – P. 6–10.

212. Randolph, S. E. Ticks and tick-borne disease systems in space and from space / S. E. Randolph // *Adv. Parasitol.* – 2000. – Vol. 47. – P. 217–243.

213. Recombinant domains III of tick-borne encephalitis virus envelope protein in combination with dextran and CpGs induce immune response and partial protectiveness against TBE virus infection in mice / A. S. Ershova, O. A. Gra, A. M. Lyaschuk [et al.] // *BMC Infectious Diseases.* – 2016. – Vol. 16 (1). – P. 544. – doi: 10.1186/s12879-016-1884-5.

214. Replication and shedding of MERS-CoV in Jamaican fruit bats (*Artibeus jamaicensis*) / V. J. Munster, D. R. Adney, N. van Doremalen [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6 (1). – P. 21878. – doi: 10.1038/srep21878.

215. Replication of MERS and SARS coronaviruses in bat cells offers insights to their ancestral origins / S. K. P. Lau, R. Y. Y. Fan, H. K. H. Luk [et al.] // Emerg. Microb. Infect. – 2018. – Vol. 7 (1). – P. 209. – doi: 10.1038/s41426-018-0208-9.

216. Reporting of new tick-borne encephalitis virus strains isolated in Eastern Siberia (Russia) in 1960–2011 and explaining them in an evolutionary context using Bayesian phylogenetic inference / A. N. Bondaryuk, E. A. Sidorova, R. V. Adelshin [et al.] // Ticks Tick Borne Dis. – 2020. – Vol. 11 (5). – P. 101496. – doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101496.

217. Reuter, J. A. High-throughput sequencing technologies / J. A. Reuter, D. V. Spacek, M. P. Snyder // Mol. Cell. – 2015. – Vol. 58 (4). – P. 586–597.

218. Review: Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis / K. L. Mansfield, N. Johnson, L. P. Phipps [et al.] // J. Gen. Virol. – 2009. – Vol. 90 (Pt 8). – P. 1781–1794.

219. Robust dengue virus infection in bat cells and limited innate immune responses coupled with positive serology from bats in IndoMalaya and Australasia / A. T. Irving, P. Rozario, P.-S. Kong [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2020. – Vol. 77 (8). – P. 1607–1622.

220. Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus / K. Achazi, D. Růžek, O. Donoso-Mantke [et al.] // Vector Borne Zoon Dis. – 2011. – Vol. 11. – P. 641–647.

221. Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus / H. Gerth, D. Grimshandl, B. Stage [et al.] // Epidemiol Infect. – 1995. – Vol. 115. – P. 355–365.

222. Růžek, D. Tick-borne encephalitis virus / D. Růžek, B. Bliski, G. Gunther // In : Neuroviral Infections: RNA Viruses and Retroviruses ; ed. by S. K. Singh, D. Ruzek. – 2013. – 519 p.

223. Schneider, H. Über epidemische akute «Meningitis serosa» / H. Schneider // Wien Klin Wochenschrift. – 1931. – Vol. 44. – P. 350–352.
224. Schwaiger, M. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA / M. Schwaiger, P. Cassinotti // J. Clin. Virol. – 2003. – Vol. 27 (2). – P. 136–145.
225. Senigl, F. Differences in maturation of tick-borne encephalitis virus in mammalian and tick cell line / F. Senigl, L. Grubhoffer, J. Kopecky // Intervirology. – 2006. – Vol. 49. – P. 239–248.
226. Senigl, F. Distribution of E and NS1 proteins of TBE virus in mammalian and tick cells / F. Senigl, J. Kopecky, L. Grubhoffer // Folia Microbiol. (Praha). – 2004. – Vol. 49. – P. 213–216.
227. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia / M. Ecker, S. L. Allison, T. Meixner [et al.] // J. Gen. Virol. – 1999. – Vol. 80. – P. 179–185.
228. Serological evidence of tick-borne encephalitis virus infection in moose and deer in Finland: sentinels for virus circulation / E. Tonteri, P. Jokelainen, J. Matala [et al.] // Parasites & Vectors. – 2016. – Vol. 9. – P. 54. – doi: 10.1186/s13071-016-1335-6.
229. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and tick-borne encephalitis virus in zoo animal species in the Czech Republic / J. Šírmárová, L. Tichá, M. Golovchenko [et al.] // Ticks and Tick-Borne Dis. – 2014. – Vol. 5 (5). – P. 523–527.
230. Sheets, R. L. Vaccine cell substrates / R. L. Sheets, J. Petricciani // Expert Rev. Vaccines. – 2004. – Vol. 3. – P. 633–638.
231. Simplistic perylene-related compounds as inhibitors of tick-borne encephalitis virus reproduction / N. A. Slesarchuk, E. V. Khvatov, A. A. Chistov [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2020. – Vol. 30 (10). – P. 127100. – doi: 10.1016/j.bmcl.2020.127100.
232. Slonim, D. Czechoslovak tick-borne encephalitis virus in chick embryo / D. Slonim // Cs. Epidem. – 1956. – Vol. 5. – P. 3–13.

233. Slonim, D. Viremia and serum antibodies in *Macacus rhesus* monkey after inapparent infection with European tick-borne encephalitis virus / D. Slonim, A. Zavadová // J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. – 1977b. – Vol. 21. – P. 460–467.

234. Slonim, D. Viremia and serum antibodies in Syrian hamsters after inapparent infection with European tick-borne encephalitis virus / D. Slonim, A. Zavadová // J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. – 1977a. – Vol. 21. – P. 162–168.

235. Some biological features of *Hyalomma marginatum* in the laboratory / B. A. Yukari, S. Nalbantoglu, Z. Karaer [et al.] // Turk. Parazit. Derg. – 2011. – Vol. 35. – P. 40–42.

236. Studying immunity to zoonotic diseases in the natural host – keeping it real / A. G. Bean, M. L. Baker, C. R. Stewart [et al.] // Nat. Rev. Immunol. – 2013. – Vol. 13. – P. 851–861.

237. Susceptibility of mosquito and tick cell lines to infection with various flaviviruses / C. H. Lawrie, N. Y. Uzcategui, M. Armesto [et al.] // Med. Vet. Entomology. – 2004. – Vol. 18 (3). – P. 268–274.

238. Süss, J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines / J. Süss // Vaccine. – 2003. – Vol. 21. – P. S19–S35.

239. Süss, J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia – An overview / J. Süss // Ticks Tick-Borne Dis. – 2011. – Vol. 2 (1). – P. 2–15.

240. The effect of temperature and fasting period on the viability of free-living females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions/ E. M. Piranda, P. H. Cancado, V. A. Raia [et al.] // Exp. Appl. Acarol. – 2008. – Vol. 45. – P. 211–217.

241. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus / G. Wallner, C. W. Mandl, C. Kunz [et al.] // Virology. – 1995. – Vol. 213. – P. 169–178.

242. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update / E. Afgan, D. Baker, B. Batut [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2018. – Vol. 46 (W2). – P. W537–W544.

243. The life cycle and biological characteristics of *Dermacentor silvarum* Olenov (Acari: Ixodidae) under field conditions / Z. Yu, H. Zheng, Z. Chen [et al.] // Vet. Parasitol. – 2010. – Vol. 168. – P. 323–328.

244. The three subtypes of tick-borne encephalitis virus induce encephalitis in a natural host, the bank vole (*Myodes glareolus*) / E. Tonteri, A. Kipar, L. Voutilainen [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 (12). – P. e81214. – doi: 10.1371/journal.pone.0081214.

245. Tick cell culture isolation and growth of *Rickettsia raoultii* from Dutch *Dermacentor reticulatus* ticks / M. P. Alberdi, A. M. Nijhof, F. Jongejan [et al.] // Ticks Tick Borne Dis. – 2012. – Vol. 3 (5-6). – P. 349–354.

246. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research / L. Bell-Sakyi, E. Zweygarth, E. F. Blouin [et al.] // Trends in Parasitology. – 2007. – Vol. 23 (9). – P. 450–457.

247. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012 / N. Hudopisk, M. Korva, E. Janet [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 19 (5). – P. 806–808.

248. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria / H. Holzmann, S. W. Aberle, K. Stiasny [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 15 (10). – P. 1671–1673.

249. Tick-borne encephalitis in Europe: a brief update on epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment / N. Riccardi, R. M. Antonello, R. Luzzati [et al.] // Eur. J. Intern. Med. – 2019. – Vol. 62. – P. 1–6.

250. Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk / Z. Balogh, E. Ferenczi, K. Szeles [et al.] // J. Virol. Methods. – 2010. – Vol. 163 (2). – P. 481–485.

251. Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications / D. Ružek, G. Dobler, O. D. Mantke // Travel Medicine and Infectious Disease. – 2010. – Vol. 8 (4). – P. 223–232.

252. Tick-borne encephalitis virus adaptation in different host environments and existence of quasispecies / R. Helmová, V. Höning, H. Tykalová [et al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12 (8). – P. 902. – doi: 10.3390/v12080902.

253. Tick-borne encephalitis virus: An emerging ancient zoonosis? / A. A. Deviatkin, I. S. Kholodilov, Y. A. Vakulenko [et al.] // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12 (2). – 247 p.

254. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host / B. Dörrbecker, G. Dobler, M. Spiegel [et al.] // *Travel Medicine and Infectious Disease*. – 2010. – Vol. 8 (4). – P. 213–222.

255. Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and hides its double-stranded RNA in intracellular membrane vesicles / A. K. Overby, V. L. Popov, M. Niedrig [et al.] // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84 (17). – P. 8470–8483.

256. Tick-borne encephalitis virus infects human brain microvascular endothelial cells without compromising blood-brain barrier integrity / M. Palus, M. Vancova, J. Širmarová [et al.] // *Virology*. – 2017. – Vol. 507. – P. 110–122.

257. Tick-borne encephalitis virus nonstructural protein NS5 induces RANTES expression dependent on the RNA-dependent RNA polymerase activity / Z. Zheng, J. Yang, X. Jiang [et al.] // *J. Immunol.* – 2018. – Vol. 201 (1). – P. 53–68.

258. Tick-borne encephalitis virus NS1 glycoprotein during acute and persistent infection of cells / J. V. Bugrysheva, V. A. Matveeva, E. Y. Dobrikova [et al.] // *Virus Research*. – 2001. – Vol. 76 (2). – P. 161–169.

259. Tick-borne encephalitis virus sequenced directly from questing and blood-feeding ticks reveals quasispecies variance / N. Asghar, P. Lindblom, W. Melik [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9 (7). – P. e103264. – doi: 10.1371/journal.pone.0103264.

260. Tick-borne encephalitis virus structural proteins are the primary viral determinants of non-viraemic transmission between ticks whereas non-structural proteins affect cytotoxicity / M. A. Khasnatinov, A. Tuplin, D. J. Gritsun [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11 (6). – e0158105. – doi: 10.1371/journal.pone.0158105.

261. Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV)-specific RT-PCR for characterization of natural foci of TBE and for other applications / J. Süss,

P. Béziat, C. Ramelow [et al.] // Zentralblatt Für Bakteriologie. – 1997. – Vol. 286 (1). – P. 125–138.

262. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts / M. Labuda, O. Kozuch, E. Zuffová [et al.] // Virology. – 1997. – Vol. 235 (1). – P. 138–143.

263. Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures / M. Hirano, K. Yoshii, M. Sakai [et al.] // J. Gen. Virol. – 2014. – Vol. 95 (Pt 4). – P. 849–861.

264. Troughton, D. R. Life cycles of seven Ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions / D. R. Troughton, M. L. Levin // J. Med. Entomol. – 2007. – Vol. 44. – P. 732–740.

265. Understanding the mechanisms underlying host restriction of insect-specific viruses / A. M. E. Elrefaey, R. Abdelnabi, A. L. Rosales Rosas [et al.] // Viruses. – 2020. – Vol. 12 (9). – P. 964. – doi: 10.3390/v12090964.

266. Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtype / I. Golovljova, O. Katargina, J. Geller [et al.] // Int. J. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 298 (S1). – P. 108–120.

267. Variability in the 3' untranslated regions of the genomes of the different tick-borne encephalitis virus subtypes / V. A. Ternovoi, A. V. Gladysheva, E. P. Ponomareva [et al.] // Virus Genes. – 2019. – Vol. 55. – P. 448–457.

268. Varma, M. G. The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arboviruses / M. G. Varma, M. Pudney, C. J. Leake // J. Med. Entomol. – 1975. – Vol. 11 (6). – P. 698–706.

269. Vince, V. Pathogenetic problems arising from experiences in series of experiments with TBE in mice / V. Vince, N. Grcevic // Tick-Borne Encephalitis : Int. Symposium Baden/Vienna (19–20th Oct. 1979, Vienna). – 1981. – P. 76–92.

270. Viperin restricts zika virus and tick-borne encephalitis virus replication by targeting NS3 for proteasomal degradation / C. Panayiotou, R. Lindqvist, C. Kurhade [et al.] // J. Virology. – 2018. – Vol. 92 (7). – e02054-17. – doi: 10.1128/JVI.02054-17.

271. Why is tick-borne encephalitis increasing? A review of the key factors causing the increasing incidence of human TBE in Sweden / T. G. Jaenson, M. Hjertqvist, T. Bergström [et al.] // *Parasites & Vectors*. – 2012. – Vol. 5 (1). – 184. – doi: 10.1186/1756-3305-5-184.

272. World Health Organization. Cell culture as a substrate for the production of influenza vaccine: memorandum from a WHO meeting / World Health Organization // *Bull. Wld Hlth Org.* – 1995. – Vol. 73. – P. 431–435.