

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРОБЛЕМ ЗДОРОВЬЯ СЕМЬИ
И РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА»**

На правах рукописи

САВИНОВА ЮЛИЯ СЕРГЕЕВНА

**КОМПЛЕКСНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО
ЭНЦЕФАЛИТА ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО
НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ**

1.5.10- вирусология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Руководитель:
доктор медицинских наук
Козлова Ирина Валерьевна

Иркутск, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Таксономия флавивирусов.....	16
1.2. Строение вириона и организация генома вируса клещевого энцефалита.....	20
1.3. Характеристика Европейского субтипа вируса клещевого энцефалита	28
1.4. Вопросы дивергенции и эволюции вируса клещевого энцефалита ..	40
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
2.1. Материалы исследования.....	44
2.1.1. Штаммы вируса клещевого энцефалита.....	45
2.1.2. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности из электронной базы данных GenBank.....	45
2.1.3. Клеточные культуры.....	49
2.2. Методы исследования.....	49
2.2.1. Вирусологические методы.....	49
2.2.2. Молекулярно-генетические методы.....	52
2.2.3. Филогенетические методы	54
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ГЕНОМОВ ШТАММОВ ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ИЗ ЭЛЕКТРОННЫХ БАЗ ДАННЫХ GENBANK	56
Глава 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО В ЗАПАДНОЙ И ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ	75
Глава 5. ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕНОТИПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ	

СИБИРИ.....	85
Глава 6. ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЙОНОВ ИЗОЛЯЦИИ ШТАММОВ ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА.....	99
Глава 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭВОЛЮЦИОННОГО ВОЗРАСТА ПОПУЛЯЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА НА ТЕРРИТОРИИ ЗАПАДНОЙ И ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ.....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	121
ВЫВОДЫ.....	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

а.о. - аминокислотный остаток

АЕ - агглютинирующие единицы

ВКЭ - вирус клещевого энцефалита

ВКЭ-ЕС (TBEV-Eur) - вирус клещевого энцефалита европейского субтипа

ВКЭ-ДВ (TBEV-FE) - вирус клещевого энцефалита дальневосточного субтипа

ВКЭ-Сиб (TBEV-Sib) - вирус клещевого энцефалита сибирского субтипа

ВКЭ-БК (TBEV-Bkl) - вирус клещевого энцефалита Байкальского субтипа

ВКЭ-Гим (TBEV-Him) - вирус клещевого энцефалита Гималайского субтипа

кДНК - ДНК, комплементарная вирусной РНК

КЛБ - Киассанурская лесная болезнь (KFD)

КЭ (КВЭ) - клещевой (вирусный) энцефалит (ТВЕ)

н.о. - нуклеотидный остаток

ОГЛ - Омская геморрагическая лихорадка (ОНЛ)

ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция обратной транскрипцией

ПТС - протаминсульфат

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РГА - реакция гемагглютинации

РДПА - реакция диффузионной преципитации в агаре

РН - реакция нейтрализации

РНК - рибонуклеиновая кислота

РТГА - реакция торможения гемагглютинации

СГТА - средняя геометрическая титров антител

СПЖ - средняя продолжительность жизни

СПЭВ - перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи

ШЭО (LIV) - Шотландский энцефаломиелит овец (louping ill)

Ala – аминокислота аланин

Arg – аминокислота аргинин

Asp – аспаргиновая кислота

ESS - effective sample size (эффективный размер выборки)

GGEV - вирус Греческого энцефалита коз (субтип LIV)
Glu – глутаминовая кислота
Gly – аминокислота глицин
HPD - high posterior density (высокая апостериорная вероятность)
Leu - аминокислота лейцин
LIV-Spain - вирус Испанского энцефалита (субтип LIV)
MCMC - Monte-CarloMarkovchain (алгоритм Монте-Карло по схеме Марковских цепей)
Met – аминокислота метионин
OHFV - вирус Омской геморрагической лихорадки
Ser - аминокислота серин
Phe - аминокислота фенилаланин
PS - path sampling (метод выборки пути, реализованный в программе BEAST)
SS - stepping-stone sampling (метод ступенчатой выборки пути, реализованный в программе BEAST)
SSEV (LIV-Spain) – вирус Испанского энцефалита овец
TBEV - вирус клещевого энцефалита
Thr – аминокислота тирозин
tMrCA - most recent common ancestor (самый недавний общий предок)
TSEV - вирус Турецкого энцефалита овец (субтип LIV)
Val - аминокислота валин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Клещевой энцефалит (КЭ) является одной из наиболее тяжелых и распространенных природно-очаговых инфекций, передающихся через укусы иксодовых клещей. Возбудителем инфекции является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), который относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*.

В настоящее время выделяют три основных субтипа ВКЭ: 1) дальневосточный (ВКЭ – ДВ); 2) европейский или западный (ВКЭ-ЕС); 3) сибирский (ВКЭ-Сиб). В последние годы описано еще два предполагаемых субтипа ВКЭ – Байкальский (ВКЭ-БК) (Демина Т.В., 2012; Козлова И.В., 2012; Kozlova I.V., 2018) и Гималайский (ВКЭ-Гим) (Dai X., 2018). Каждый из субтипов вируса, кроме Гималайского, имеет собственный ареал, ассоциирован с определенным видом клеща-переносчика и кругом позвоночных хозяев, обладает различной степенью патогенности для человека.

Центральная и Северная Европа являются зонами доминирования ВКЭ-ЕС. Циркуляция этого варианта вируса также выявлена на территории европейской части России, в Южной Корее и Северной Африке (Тунис) (Kim S.Y., 2008; Yun S.M., 2009; Козлова И.В., 2016; Fares W., 2021). В настоящее время в Европе наблюдается расширение ареала ВКЭ-ЕС, увеличение уровня заболеваемости, рост числа стран в которых регистрируются случаи КЭ (Gritsun T.S., 2003; Ruzek D., 2010; Suss J., 2007, 2011; Коренберг Э.И., 2013; Савинова Ю.С., 2021). В последние годы появились сведения о тяжелых случаях заболевания, вызванных данным вариантом вируса. При этом ранее считалось, что штаммы ВКЭ-ЕС обладают меньшей вирулентностью и нейроинвазивностью и по сравнению со штаммами других субтипов вируса и с ним ассоциированы заболевания человека с более мягким течением и благоприятным исходом (Dobler G., 2019; Злобин В.И., 1996; Вотяков В.И., 2002; Zajkowska J., 2013; Bogovic P., 2015; Ruzek D., 2019; Савинова Ю.С., 2021).

Данные, полученные рядом авторов, свидетельствуют о стабильности генома ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Европы и его более древнем происхождении (Zanotto P.M., 1995; Gaumann R., 2011; Weidmann M., 2013; Ruzek D., 2006; Dobler G., 2012). Однако появившиеся недавние сведения о новых дивергентных вариантах ВКЭ-ЕС в Нидерландах (Jahfari S., 2017) и Великобритании (Holding M., 2019), расширяющих установленные ранее границы варибельности внутри данного субтипа вируса, а также наличие крайне противоречивых результатов, полученных при реконструкции эволюционной истории ВКЭ-ЕС разными авторами, свидетельствуют об актуальности продолжения филогенетических и филогеографических исследований.

Степень разработанности темы

Представления о том, что существует как минимум два подтипа ВКЭ, первоначально были основаны на изучении их антигенных свойств и особенностей экологии. Первый штамм ВКЭ европейского подтипа был выделен М.П. Чумаковым из клещей *I. ricinus* в 1939 г. в Белоруссии. В дальнейшем было показано, что переносчиком ВКЭ европейского подтипа является клещ *I. ricinus*, а не *I. persulcatus* как у дальневосточного подтипа вируса. При изучении антигенных свойств было отмечено, что ни один штамм, выделенный в европейских странах, т.е. в отдалении от ареала восточного варианта вируса, не мог быть отнесен к нему по антигенным взаимоотношениям. Были выявлены существенные клинико-патогенетические различия ВКЭ дальневосточного и европейского подтипов.

Несмотря на то, что в музейных коллекциях ряда научных учреждений Сибири уже давно хранились штаммы ВКЭ западного подтипа, их исследование с помощью современных молекулярно-генетических методов началось относительно недавно.

Новый молекулярно-генетический этап в изучении ВКЭ, в том числе ВКЭ-ЕС начался с расшифровки Плетневым А.Г. и др., и Mandl C.W. et al. полных геномов восточного (*Sofjin*) и европейского (*Neudoerfl*) штаммов. Было

установлено, что ВКЭ-ЕС имеет значительные генетические отличия от ВКЭ-ДВ (14,6-16,5% в нуклеотидной и 5,0-6,8% в аминокислотной последовательностях полипротеина). На основании изучения коллекционных штаммов с помощью методов молекулярной эпидемиологии была получена картина географического распространения ВКЭ-ЕС на территории бывшего СССР. В последние годы появились новые данные о случаях изоляции штаммов ВКЭ-ЕС на территории Западной и Восточной Сибири, получили этиологическое подтверждение случаи заболеваний, связанные с данным вариантом вируса в регионе, в том числе с летальным исходом (Сидорова Е.А., 2019).

В настоящее время установлено, что зоной абсолютного доминирования ВКЭ-ЕС являются Центральная и Северная Европа. Восточной границей ареала, где на сегодняшний день выявлен ВКЭ-ЕС, является Южная Корея. Учитывая абсолютное доминирование ВКЭ-ЕС в Европе, его экология, генетические и фенотипические свойства относительно хорошо изучены (Козлова И.В., 2016; Савинова Ю.С., 2021). Установлен основной переносчик и резервуарный хозяин ВКЭ-ЕС в Европе - клещ *I. ricinus* (Nosek J., 1970; Gaumann R., 2010; Chitimia-Dobler L., 2019; Klaus C., 2013). Выявлен спектр компетентных позвоночных хозяев ВКЭ-ЕС, играющих основную роль в резервации и передаче вируса (Chitimia-Dobler L., 2019), описаны биотопы, в которых происходит его циркуляция.

На территории Сибири ВКЭ-ЕС циркулирует в экосистемах значительно отличающихся от основного европейского ареала вируса составом природных комплексов и биоценозов (Савинова Ю.С., 2021). В связи с этим научный интерес представляет изучение и сравнительный анализ генетических, фенотипических свойств и экологических особенностей штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных в удаленных друг от друга точках ареала (Европа и Восточная Сибирь) (Савинова Ю.С., 2021). Пристального внимания заслуживает вопрос об адаптационном потенциале ВКЭ-ЕС, позволяющем ему приспосабливаться к циркуляции в различных экосистемах на территории Европы и Азии (Савинова

Ю.С., 2021). Требуют уточнения данные о стабильности генома ВКЭ-ЕС в Сибири, необходима реконструкция его эволюционной истории на территории региона, установление филогенетических связей между штаммами из Сибири и изолятами из Европы, европейской части России и Южной Кореи. Всё вышеперечисленное определяет актуальность проведения исследований, направленных на получение комплексной характеристики ВКЭ-ЕС на территории Сибири.

Цель работы - выявление генетических, фенотипических, экологических и эволюционных особенностей вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, циркулирующего на территории Сибири.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ геномов штаммов ВКЭ-ЕС из Европы, Южной Кореи и Сибири и выявить генетические особенности штаммов ВКЭ-ЕС из Западной и Восточной Сибири. Оценить особенности генетической характеристики штаммов ВКЭ-ЕС в зависимости от источника и территории изоляции штаммов.

3. Изучить фенотипические свойства штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных на территории Сибири (степень нейровирулентности, инвазивные свойства; генетические признаки, обусловленные белками оболочки вирионов; маркеры, связанные с внутриклеточной репродукцией вируса).

4. Получить характеристику биотопов в которых выявлена циркуляция ВКЭ-ЕС на территории Восточной и Западной Сибири.

5. Определить эволюционный возраст популяции ВКЭ-ЕС, циркулирующей в Западной и Восточной Сибири.

6. Дать комплексную характеристику ВКЭ-ЕС на территории Сибири.

Научная новизна и теоретическая значимость исследования

Впервые получена комплексная характеристика ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Сибири, за пределами его основного европейского ареала, реконструирована его эволюционная история. С помощью филогенетического анализа показано, что уровень различий между

нуклеотидными последовательностями кодирующей части генома у ВКЭ-ЕС и другими субтипами вируса сопоставим или даже превышает таковой между штаммами ВКЭ-ЕС и вирусами группы *Louping ill*. Впервые в ходе сравнительного геномного и биоинформационного анализа нуклеотидных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС установлено, что штаммы из Сибири формируют две отдельные клады в составе самого обширного кластера, образованного штаммами из Восточной, Западной, Северной Европы и штаммами из Южной Кореи. В результате сравнительного анализа геномов штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных из различных источников, высказано предположение о том, что кластеризация штаммов на дендрограммах в большей степени зависит от места их изоляции, нежели от источника и года их выделения.

Впервые охарактеризованы генетические особенности штаммов ВКЭ-ЕС из Западной и Восточной Сибири. Установлено, что сибирская популяция ВКЭ-ЕС на обследованных территориях представлена двумя генетическими линиями - восточносибирской и западносибирской, которые отличаются друг от друга по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B. В варибельной части 3'-нетранслируемой области генома у штаммов ВКЭ-ЕС из Сибири выявлены делеции сопоставимые по длине со штаммом *Huyp* (U39292) из Чешской Республики. Не установлено связи между наличием делеции в геноме и вирулентностью штаммов ВКЭ-ЕС из Сибири. Впервые показано, что ВКЭ-ЕС успешно интродуцировался в экосистемы Западной и Восточной Сибири, однако основным переносчик и спектр мелких млекопитающих, поддерживающих циркуляцию данного варианта вируса на территории региона, имеют отличия от таковых на территории Европы. Показано, что основным переносчиком ВКЭ-ЕС в Сибири является клещ *I. persulcatus*, а циркуляция ВКЭ-ЕС на территории региона поддерживается несколькими видами грызунов, преимущественно полевками (красная, красно-серая, узкочерепная, полевка-экономка, плоскочерепная, большеухая), а также сусликами (суслик длиннохвостый), насекомоядными (бурозубка),

зайцеобразными (алтайская пищуха) и некоторыми видами птиц (горный конек). Показано, что ВКЭ-ЕС в азиатской части России существует в различных климатогеографических условиях: от умеренно- до резко континентального, от засушливого до увлажненного климата. Он заселяет горно-таежные, таежные, лесные, лесостепные и степные ландшафты, встречается в различных типах рельефа - от равнин до среднегорья (высота выше 2000 м).

Установлена гетерогенность популяции ВКЭ-ЕС по фенотипическим свойствам на территории Сибири (S-признак, rct_{42} и T_{50} признаки, вирулентности и нейроинвазивности). Впервые с помощью метода Байесовских Марковских цепей Монте-Карло определено время дивергенции западносибирского и восточносибирского варианта ВКЭ-ЕС от ближайшего общего предка, которое составило 663 года (95% HPD, 399-971). Показано, что западносибирский вариант ВКЭ-ЕС является более молодым, время дивергенции для него составляет 314 лет (95% HPD, 196-453).

Теоретическая значимость работы заключается в расширении имеющихся на сегодняшний день фундаментальных знаний о генетике, генетической изменчивости, экологии и эволюции ВКЭ.

Практическая значимость

Проведенное исследование имеет не только научное, но и важное прикладное значение, так как данные об особенностях генетической организации и фенотипической изменчивости ВКЭ являются научной базой для дальнейшего совершенствования методов диагностики и профилактики этой инфекции. Создана база данных «Генетические и фенотипические свойства штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, изолированных на территории Евразии» (свидетельство о государственной регистрации №2017620500 от 3.05.2017 г.), которая позволяет: проводить сравнительный анализ геномов и фенотипических свойств штаммов ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Европы и Азии, осуществлять целенаправленный скрининг штаммов по отдельным категориям (источник, страна, год изоляции, наличие

информации о биологических свойствах), использовать эти данные для эволюционных построений, поиска сайтов рекомбинации, а также для дальнейшего совершенствования методов диагностики и профилактики этой инфекции.

Расшифрован полный геном восьми штаммов ВКЭ-ЕС из Сибири, нуклеотидные последовательности которых депонированы в международную электронную базу данных GenBank: 1G-98(KY069119); 118-71 (KY069120); 163-74 (KY069121); 262-74 (KY069122); 126-71 (KY069123); *Zmeinogorsk-1* (KY069124); *Zmeinogorsk-5* (KY069125); *Zmeinogorsk-9* (KY069126).

Методология и методы исследования

Достижение поставленной цели осуществлялось путем комплексного подхода к решению задач с использованием набора классических и современных методов исследования. Результаты были получены при помощи вирусологических (культивирование вирусов *in vitro* и *in vivo*, титрование по ЦПД, бляшкообразованию, определение S-признака, T₅₀ и Rct₄₂-признаков), молекулярно-биологических (выделение нуклеиновых кислот, обратная транскрипция, ПЦР, полногеномное секвенирование методом Сэнгера) и методов биоинформатического анализа (сборка и анализ полногеномных последовательностей, филогенетический и эволюционный анализ).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. На территории Сибири циркулирует гетерогенная по фенотипическим и генетическим свойствам популяция ВКЭ-ЕС.
2. ВКЭ-ЕС на территории Сибири представлен двумя генетическими вариантами – восточносибирским и западносибирским, которые отличаются друг от друга по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B.
3. Время дивергенции восточносибирского и западносибирского вариантов от ближайшего общего предка составляет 663 года (с 95% ДИ 399-971), при этом западно-сибирский вариант ВКЭ-ЕС является более молодым (tMRCA составляет 314 лет (95% ДИ 196-453)).

4. Несмотря на циркуляцию на территориях, значительно различающихся по климатическим условиям, рельефу, ландшафту, характеристикам биотопов ВКЭ-ЕС на территории Сибири обладает высоким уровнем стабильности генома, его генетические различия не превышают таковых для основной части штаммов данного субтипа из Европы.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивается комплексным подходом к их достижению с привлечением современных вирусологических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов, а также научно обоснованными выводами и наличием научных публикаций в высокорейтинговых журналах. Результаты работы неоднократно представлялись автором на различных международных конференциях.

Основные результаты исследований по теме диссертации были представлены: на международной 15th Medical Biodefense Conference (Munich, Germany, 2016); 83-ей Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием, посвященной 140-летию со дня рождения профессора Н.Д. Бушмакина (Иркутск, 2016); научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе», (Новосибирск, 2016); International scientific-practical conference «Climate, ecology, agriculture of Eurasia» (Ulaanbaatar, Монголия, 2017); International Symposium on Tick-Borne Pathogens and Disease ITPD 2017 (Vienna, Austria, 2017); Российской научной конференции, посвящённой 80-летию открытия вируса клещевого энцефалита «Клещевой энцефалит и другие переносимые клещами инфекции» (Москва, 2017); конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням 2018 г. (Новосибирск, 2018); IV Национальном конгрессе бактериологов и Международном симпозиуме «Микроорганизмы и биосфера «MICROBIOS-2018» (Омск, 2018); 16-th Medical Biodefense Conference (Munich, Germany, 2018); III Байкальской международной научной конференции «Природно-

очаговые трансмиссивные инфекции» (Иркутск, 2018); Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, Беларусь, 2018); Российской научно-практической конференции «Управляемые и другие социально-значимые инфекции: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2019); International Symposium on Tick-Borne Pathogens and Disease (Vienna, Austria, 2019); 14-th International Symposium on Ticks and Tick-borne Diseases (ISTTBD-XIV) (Weimar, Germany, 2021); Международной научной конференции «Россия и Монголия: результаты и перспективы научного сотрудничества» (Иркутск, 2022); Региональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Сибири и Дальнего Востока» (Иркутск, 2022); Российской научно-практической конференции с трансляцией в интернет «Управляемые и другие социально-значимые инфекции: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2023).

Публикации по материалам исследования

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 7 статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, две коллективные монографии и одна публикация в зарубежном журнале (Web of Science, Q2).

Личный вклад автора

Автором получены основные результаты, представленные в работе, осуществлен анализ данных и сформулированы выводы, проведено большинство лабораторных исследований. Секвенирование штаммов ВКЭ-ЕС было выполнено в Центре секвенирования ДНК СО РАН (г. Новосибирск) в сотрудничестве с к.б.н. С.Е. Ткачевым (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск). Изучение генетических признаков, определяемых «*in vitro*» и признаков, связанных с вирулентностью у штаммов ВКЭ-ЕС из Восточной Сибири выполнено совместно с д.б.н. М.М. Верховиной. Филогенетический анализ проведен в сотрудничестве с к.б.н. Ю.С.

Букиным (Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск) и А.И. Парамоновым (ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ).

Часть исследований выполнена в рамках гранта РФФИ №14-15-00615 «Сравнительный геномный и биоинформационный анализ штаммов европейского субтипа вируса клещевого энцефалита, циркулирующего в экосистемах Сибири и Западной Европы», участником, которого являлась автор диссертации.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 153 страницах, иллюстрирована 20 рисунками и 24 таблицами. Библиографический указатель содержит 196 источников, из которых 27 - работы отечественных и 169 - зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящее время все более значительную роль в инфекционной патологии человека стали играть флавивирусы (вирусы клещевого энцефалита, желтой лихорадки, Западного Нила, денге, лихорадки Зика, гепатита С и др.). Флавивирусы встречаются на всех континентах земного шара кроме Антарктиды. Они способны вызывать заболевания человека, основными клиническими проявлениями которых являются лихорадки и энцефалиты. Наиболее распространенной флавивирусной инфекцией, передающейся через укус иксодовых клещей, на территории Евразии является клещевой энцефалит (КЭ).

1.1. Таксономия флавивирусов

Согласно современной классификации вирусов [<https://talk.ictvonline.org/>] семейство *Flaviviridae* включает четыре рода: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Pegivirus* и *Hepacivirus* (Рис. 1.1). Род *Flavivirus* является самым многочисленным, он объединяет в себя 53 вида, включает 75 различных флавивирусов. Внутри рода *Flavivirus* в зависимости от переносчика выделяют три группы флавивирусов: 1) флавивирусы, переносимые клещами; 2) флавивирусы, переносимые комарами (группы: *Aroa*, *Dengue*, *Japanese encephalitis*, *Kokobera*, *Ntaya*, *Yellow fever*, *Kedougou* и *Edge Hill*) и 3) флавивирусы для которых вектор неизвестен (группы: *Entebbebat*, *Modoc* и *RioBravo*) (Рис. 1.2) [<https://talk.ictvonline.org/>].

В группе флавивирусов, передаваемых через укус клеща, различают флавивирусы, хозяевами которых являются млекопитающие и флавивирусы, ассоциированные с морскими птицами. Первая из этих групп связана с иксодовыми клещами, эти флавивирусы, как правило, патогенны для человека. Вторая группа вирусов ассоциирована с клещами рода *Ornithodoros*, паразитирующих на морских птицах. Вирус *Kadam* предположительно также относится к группе вирусов, передаваемых через укус клеща (Табл. 1.1.) [<https://talk.ictvonline.org/>].

Кроме того с семейством *Flaviviridae* ассоциировано несколько групп неклассифицированных вирусов: 1) вирусы, передающиеся через укус клеща; 2) вирусы, передающиеся через укус комара; 3) флавивирусы специфичные для насекомых; 4) вирусы с неизвестным вектором среди членистоногих; 5) многокомпонентные (сегментированные) флавивирусподобные вирусы [<https://talk.ictvonline.org/>].

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ, TBEV) относится к флавивирусам, переносимыми клещами. Различают три основных субтипа этого вируса: европейский (западный, ВКЭ-ЕС, прототипный штамм *Neudoerfl*), дальневосточный (ВКЭ-ДВ; ранее весенне-летний энцефалит; штамм-прототип *Sofjin*) и сибирский (урало-сибирский, ВКЭ-Сиб, прототипные штаммы - *Заусаев* и *Васильченко*). Различия между субтипами на нуклеотидном уровне достигают 17%, а на аминокислотном - 3,6-5,6% замен, тогда как изоляты, принадлежащие к одному субтипу, на нуклеотидном уровне могут быть идентичны на 99% и более, имеют до 2,2% аминокислотных замен.

На фенотипическом уровне субтиповой полиморфизм проявляется наличием специфичного набора 21 маркерных (signature) аминокислотных замен в белке Е, которые коррелируют с антигенными свойствами вирусов. При этом аминокислота, находящаяся в позиции E₂₀₆, является уникальной для каждого субтипа ВКЭ (Gritsun T.S., 1995; Ecker M., 1999). Все штаммы ВКЭ-ДВ имеют в положении 206 Ser (серин), штаммы ВКЭ-ЕС – Val (валин), ВКЭ-Сиб – Leu (лейцин) (Ecker M., 1999). Кроме того в настоящее время описано еще два потенциальных субтипа ВКЭ - Байкальский (TBEV-Bkl; ранее - «группа 886-84», прототипный штамм – 886-84) и Гималайский (Himalayan –TBEV-Him).

Байкальский субтип циркулирует на территории Восточной Сибири и северной Монголии, штамм этого субтипа был также выделен в Новосибирской области (Демина Т.В., 2012; Козлова И.В., 2012; Rar V.A., 2017; Kozlova I.V., 2018). Гималайский субтип недавно был выявлен у диких грызунов на плато Цинхай-Тибет в Китае (Dai X., 2018).

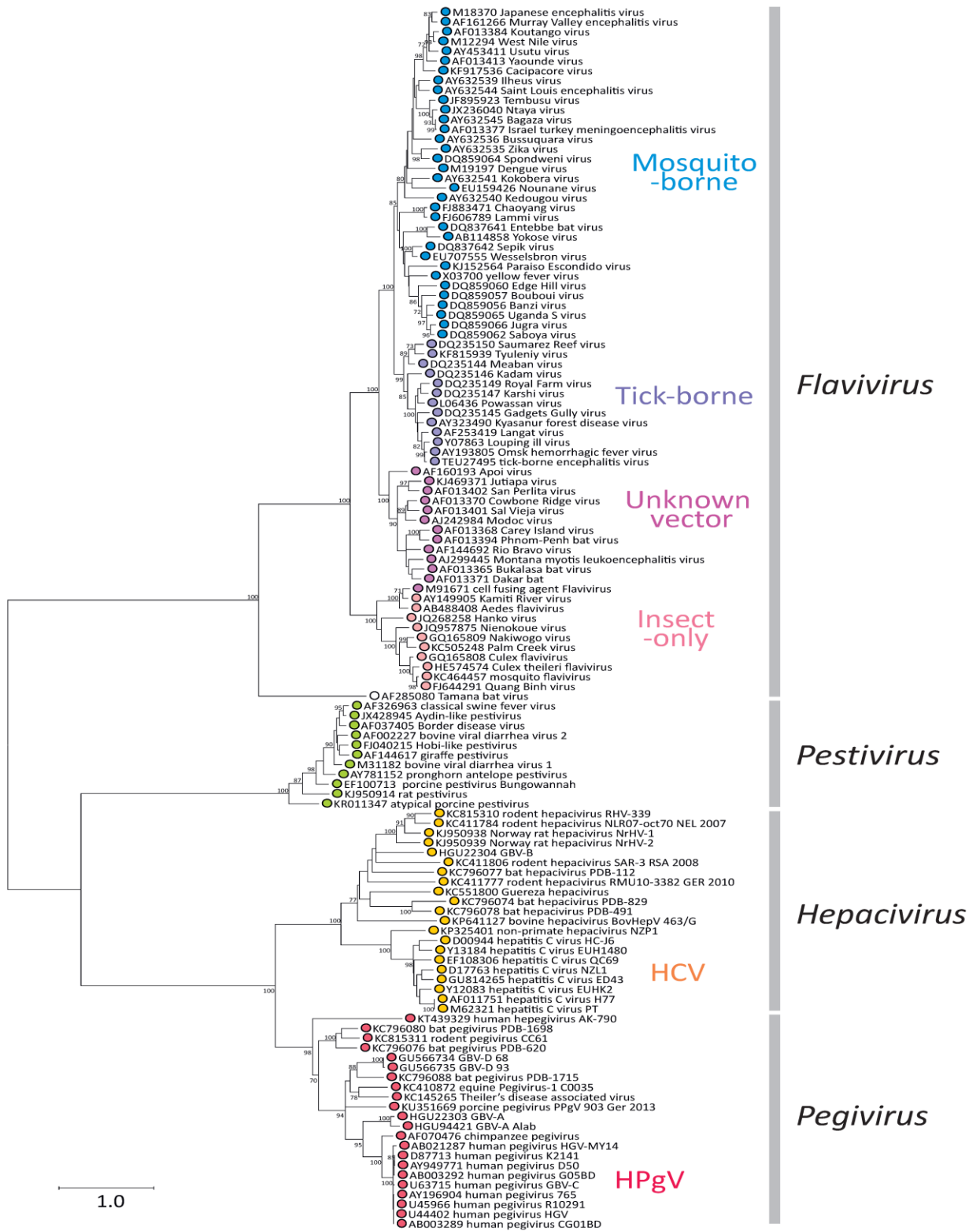


Рисунок 1.1 - Филогенетическое дерево, построенное на основе консервативных аминокислотных последовательностей в RdRP (NS5-NS5B) членов семейства Flaviviridae [<https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/>].

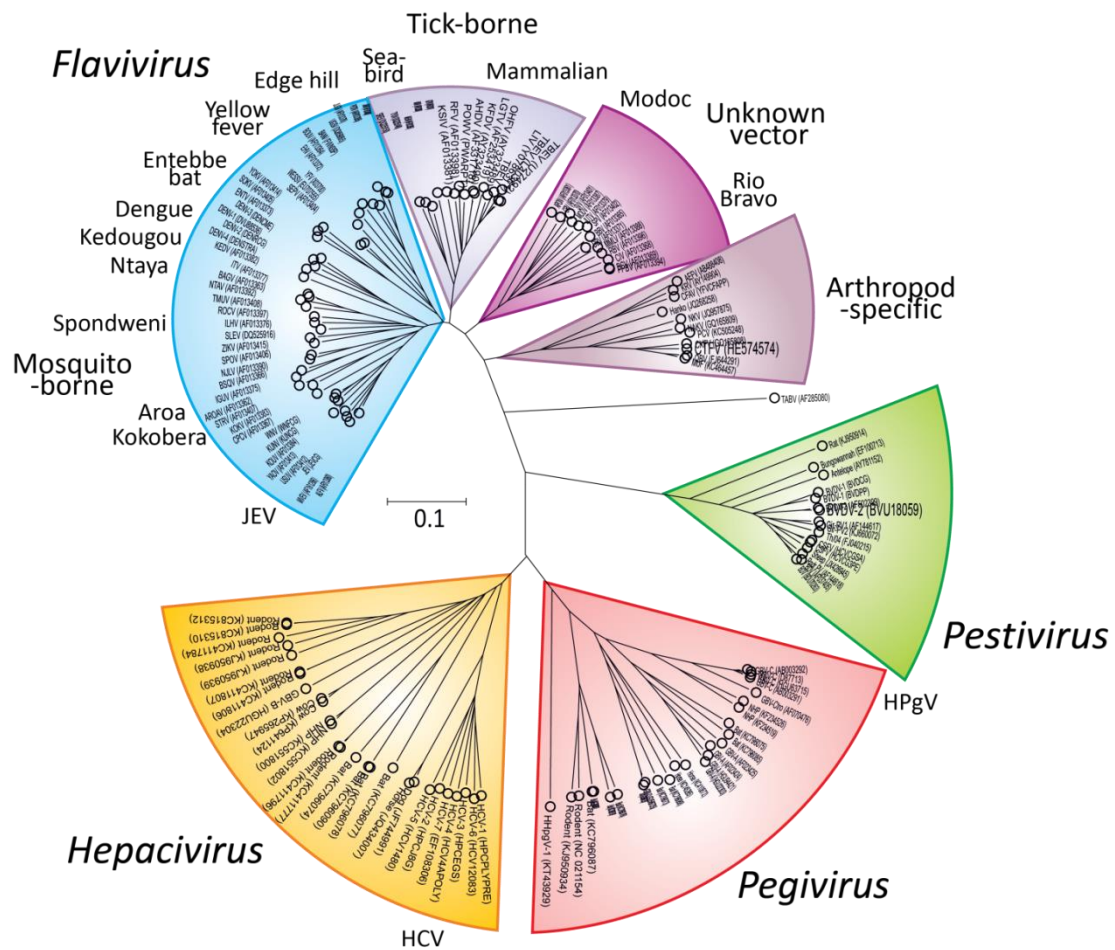


Рисунок 1.2 - Филогенетическое дерево семейства Flaviviridae.

Таблица 1.1 - Флавивирусы, переносимые клещами

Вид вируса	Название вируса	Номер в GenBank	Аббревиатура
<i>Tick-borne, mammalian host</i> (флавивирусы переносимые клещами, хозяева – млекопитающие)			
<i>Gadgets Gully virus</i>	Gadgets Gully virus	<u>DQ235145</u>	GGYV
<i>Kyasanur Forest disease virus</i>	Kyasanur Forest disease virus	<u>AY323490</u>	KFDV
	Alkhumra hemorrhagic fever virus	<u>AF331718</u>	AHFV
<i>Langat virus</i>	Langat virus	<u>AF253419</u>	LGTV
<i>Louping ill virus</i>	Louping ill virus	<u>Y07863</u>	LIV
	British subtype	<u>D12937</u>	LIV-Brit
	Irish subtype	<u>X86784</u>	LIV-Ir
	Spanish subtype	<u>DQ235152</u>	LIV-Spain
	Turkish sheep encephalitis virus subtype	<u>DQ235151</u>	TSEV
	Greek goat encephalitis virus subtype	<u>DQ235153</u>	GGEV
<i>Omsk hemorrhagic fever virus</i>	Omsk hemorrhagic fever virus	<u>AY193805</u>	OHFV
<i>Powassan virus</i>	Powassan virus	<u>L06436</u>	POWV
	deer tick virus	<u>AF311056</u>	DTV
<i>Royal Farm virus</i>	Royal Farm virus	<u>DQ235149</u>	RFV
<i>Tick-borne encephalitis virus</i>	European subtype	<u>U27495</u>	TBEV-Eur
	Far Eastern subtype	<u>X07755</u>	TBEV-FE
	Siberian subtype	<u>L40361</u>	TBEV-Sib
<i>Tick-borne, seabird host</i> (флавивирусы переносимые клещами, хозяева – морские птицы)			
<i>Meaban virus</i>	Meaban virus	<u>DQ235144</u>	MEAV
<i>Saumarez Reef virus</i>	Saumarez Reef virus	<u>DQ235150</u>	SREV
<i>Tyuleniy virus</i>	Tyuleniy virus	<u>KF815939</u>	TYUV
<i>Probably tick-borne</i> (флавивирусы, вероятно переносимые клещами)			
<i>Kadam virus</i>	Kadam virus	<u>DQ235146</u>	KADV

1.2. Строение вириона и организация генома вируса клещевого энцефалита

Вирионы ВКЭ имеют молекулярную массу $2,63 \cdot 10^4$ кДа. Они представляют собой сферические частицы диаметром 50 нм с электронноплотной сердцевиной (нуклеокапсидом), которые окружены белково-липидной оболочкой (Fauquet С.М., 2005; Knipe D.М., 2013).

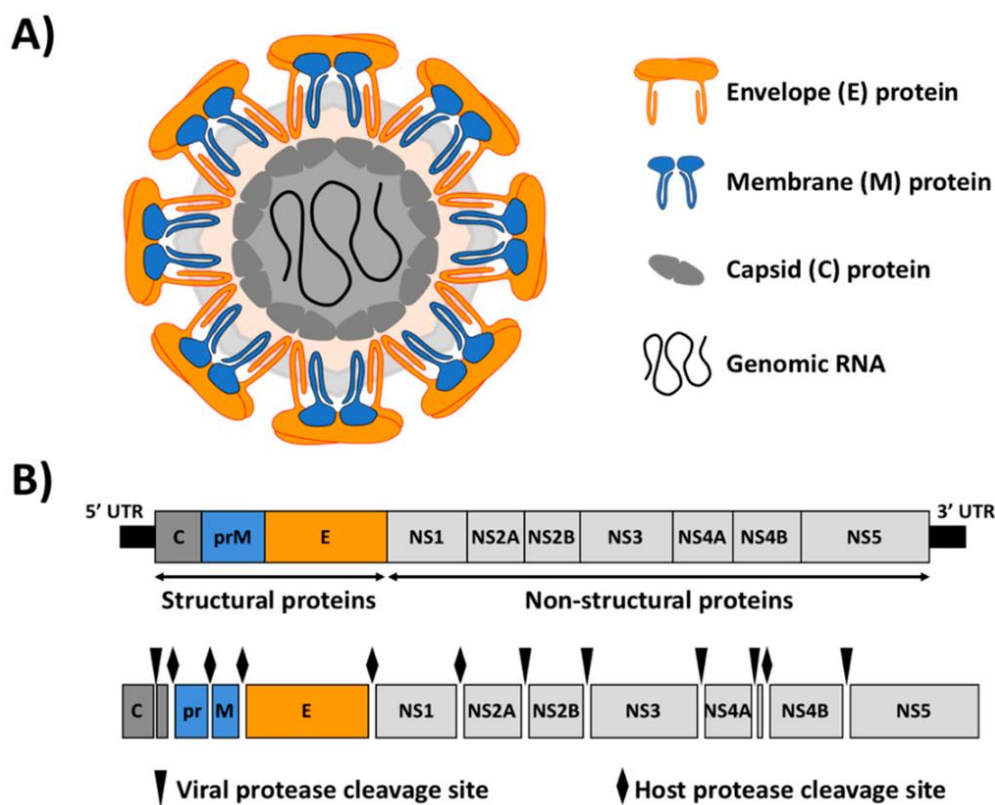


Рисунок 1.3 - Схема организации генома вируса клещевого энцефалита (Füzik T., 2018).

Примечание: кодирующая часть генома с указанием генов обозначена прямоугольниками.

В составе оболочки вириона присутствуют два белка: матричный белок М, имеющий молекулярную массу 7-9 кДа и гликопротеин Е с молекулярной массой 51-59 кДа, которые закреплены в бислое липидов с помощью трансмембранных гидрофобных участков-«якорей» (1.3А) (Füzik T., 2018). Поверхность вириона покрыта небольшими выступами, которые образованы гликанами, прикрепленными к молекулам белка Е. Нуклеокапсид икосаэдрической формы, имеет размеры 20-30 нм, представляет собой комплекс белка С с геномной одноцепочечной РНК (Zhang X., 2013). В своем составе вирусная частица содержит 68% белка, 8% РНК, 17% липидов и 9% углеводов.

Геном ВКЭ представлен SS(+) РНК общей длиной около 10,5 тыс. нуклеотидов и состоит из 5'- и 3'- нетранслируемых областей (UTR) и кодирующей области между ними (Рис. 1.3В) (Pletnev A.G., 1990). На 5'-конце

генома флавивирусов располагается кэп I типа m⁷GpppAmpN₁pN₂ (Wengler G., 1987; Liu L., 2010).

Длина **5'-UTR** РНК ВКЭ составляет около 130 нуклеотидов, а **3'-UTR** - 350-750 нуклеотидов (Добрикова Е.Ю., 1995; Wallner G., 1995; Gritsun T.S., 2003; Локтев В.Б., 2007). Размеры и последовательности этих областей у разных штаммов ВКЭ варьируют. Однако они имеют выраженную вторичную структуру, которая, вероятно, играет роль *cis*-регуляторного элемента при репликации или трансляции геномной РНК, а также при ее упаковке в вирион (Gritsun T.S., 1997; Proutski V., 1997; Rauscher S., 1997) (Рис. 1.4). Это считается одним из механизмов адаптации репликации вируса в различных хозяевах (Turner C., 2004; Gritsun T.S., 2007).

3'-нетранслируемая область генома имеет переменный участок, который гетерогенен по длине, а также высококонсервативный фрагмент, который состоит из 350 нуклеотидов. Он располагается на 3'-конце и содержит несколько потенциально важных мотивов и элементов вторичной структуры. Также, в последовательностях 3'-UTR различных флавивирусов, переносимых клещами, были выявлены короткие прямые повторы длиной около 25-70 нуклеотидов (Добрикова Е.Ю., 1995; Wallner G., 1995; Gritsun T.S., 1997, Ткачев С.Е., 2015).

При исследованиях зависимости влияния строения 3'-нетранслируемой области на биологические свойства вируса корреляции между длиной этого участка генома и титрами гемагглютинации не выявлено. Но было выявлено, что у штаммов ВКЭ с короткими (менее 200 нуклеотидных остатков) последовательностями 3'-некодирующей части геномов инкубационный период при заражении ими мышей-сосунков значительно удлинялся (Morozova O.V., 2007).

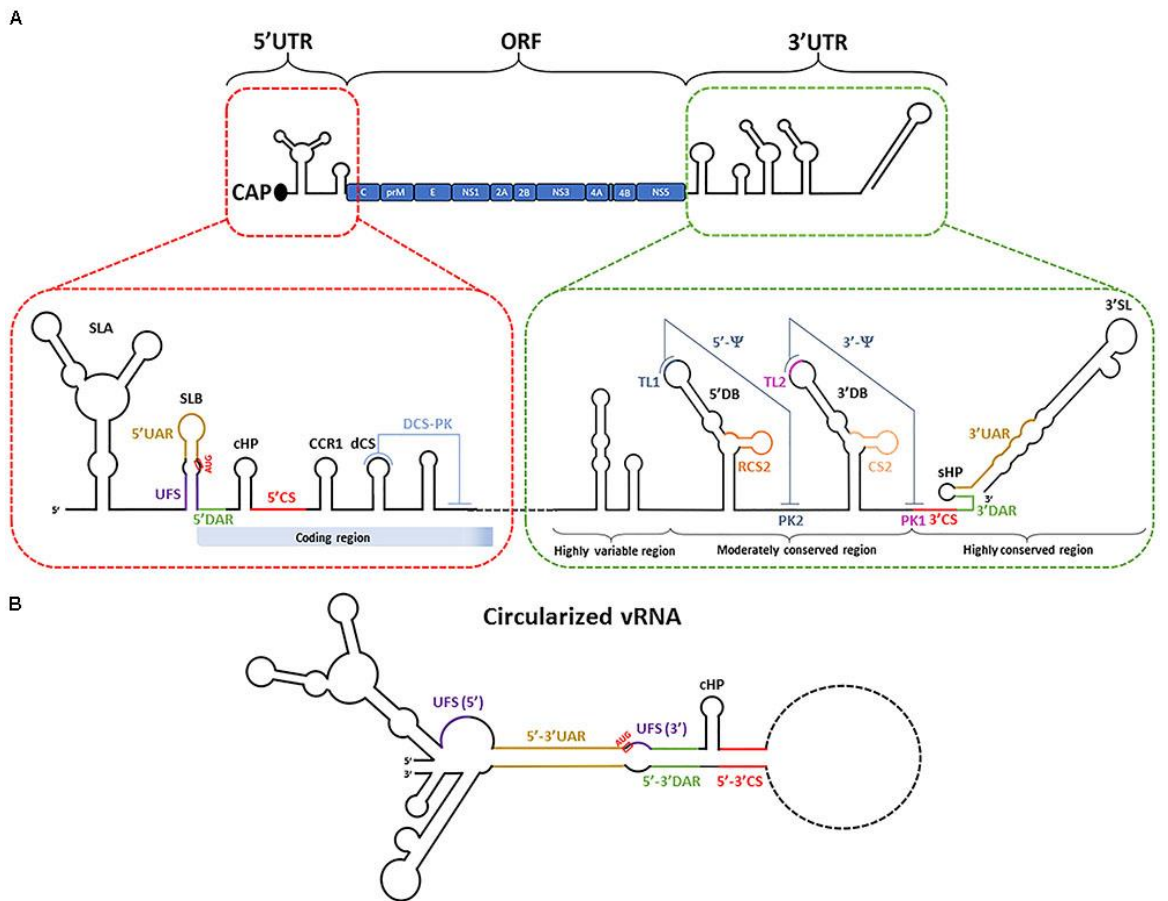


Рисунок 1.4 - Строение 3'и 5' нетранслируемых областей (UTR) генома ВКЭ (Mazeaud С., 2018a) строение UTRгенома ВКЭ; б) прогнозируемая структура вирусной РНК в ее циркуляризованной конформации.

В 5'-концевой четверти генома локализованы гены структурных белков - С, рМ и Е. Гены неструктурных белков NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5 расположены в 3'-концевой части генома (Рис. 1.5).

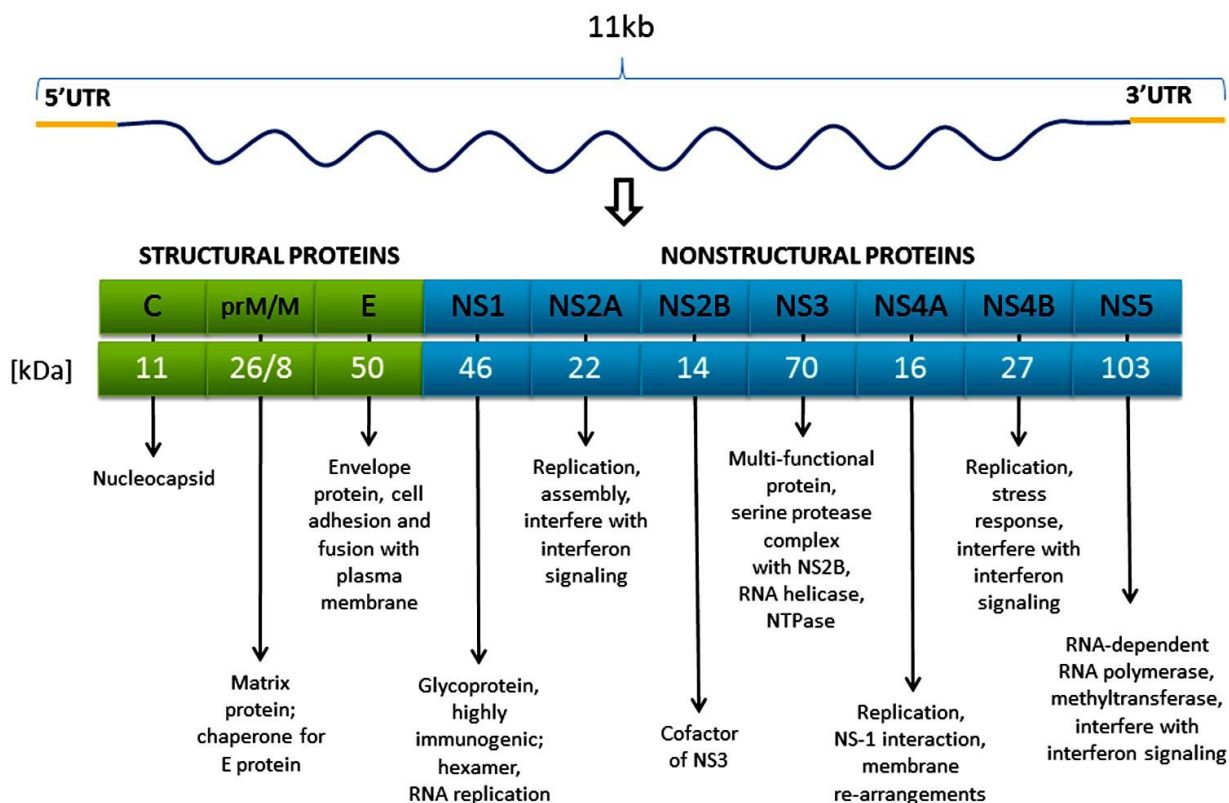


Рисунок 1.5 - Организация генома вируса клещевого энцефалита с указанием основных функций белков, схема процессинга полипротеина (Ruzek D., 2019).

Структурные белки

Белок капсида С (C-core) является одним из наиболее вариабельных белков флавивирусов (Pletnev A.G., 1990). Он имеет молекулярную массу около 12-15 кДа (Heinz F.X., 1980; Chambers T.J., 1990). Множество его копий в виде димеров и одна копия геномной вирусной РНК образуют нуклеокапсид (Jones C.T., 2003; Dokland T., 2004; Ma L., 2004). На С- и N-концах белка находятся участки, обогащенные положительно заряженными остатками основных аминокислот (до 20-25%), необходимых для взаимодействия с вирусной РНК при формировании нуклеокапсида вириона (Chambers T.J., 1990; Patkar C.G., 2007). В центральной части белка содержится кластер незаряженных аминокислотных остатков, который играет важную роль в сборке и

формировании вирионных частиц, а также обеспечивает связь нуклеокапсида с липопротеиновой оболочкой вириона (Markoff L., 1997).

Мембранный белок M имеет молекулярную массу около 8 кДа, он образуется путем протеолитического расщепления своего предшественника полипептида *prM* клеточными протеазами (Chambers T.J., 1990; Allison S.L., 1995; Li L., 2008). N-конец белка *prM* содержит сайты гликозилирования и шесть консервативных остатков цистеина, формирующих три внутримолекулярных S-S мостика (Li L., 2008; Nowak T., 1987). На первых стадиях сборки в клетке, вирион существует в виде внутриклеточной незрелой вирусной частицы, содержащей белок-предшественник *prM*, заякоренный C-терминальным концом в вирусной мембране и формирующий гетеродимерный комплекс с белком оболочки вириона E в соотношении 1:1 (Perera R., 2008, Allison S.L., 1995; Li L., 2008; Wengler G., 1989; Heinz F.X., 1994; Lorenz I.C., 2002, Ткачев С.Е., 2015). Совместный синтез белков *prM* и E необходим для правильного сворачивания, ориентации в пространстве, ассоциации с мембраной и эффективной секреции белка E флавивирусов, так как одной из функций белка *prM* является защита белка E от необратимых конформационных изменений во время транспорта гетерокомплекса *prM*-E через ЭПР и аппарат Гольджи (Allison S.L., 1995; Li L., 2008; Heinz F.X., 1994; Lorenz I.C., 2002; Konishi E. 1993). Расщепление *prM* сопровождается изменением конформации поверхностного белка оболочки вириона E, после чего происходит созревание вириона, и он приобретает способность инфицировать клетку (ra R., 2008; Wengler G., 1987; Allison S.L., 1995; Heinz F.X., 1994, Stadler K., 1997; Elshuber S., 2003).

Белок оболочки вириона E является основным структурным гликопротеином оболочки ВКЭ, который опосредует связывание вируса с клеточными рецепторами, определяет тропизм, вирулентность вируса, является одной из основных антигенных детерминант, обеспечивающих образование вируснейтрализующих антител (Füzik T., 2018). Он имеет молекулярную массу около 50 кДа, содержит 496 а.о. Белок E состоит из большой вневирионной

части (домены А, В и С), трансмембранного якоря и короткого пептида, находящегося под липидной оболочкой вириона (Heinz F.X., 1993). Его пространственную структуру стабилизируют шесть внутримолекулярных дисульфидных мостиков, содержащих 12 остатков цистеина (Nowak T., 1987).

Неструктурный белок NS1 представляет собой гликопротеин, который содержит от одного до трех потенциальных сайтов гликозилирования и 12 консервативных цистеинов, образующих дисульфидные мостики (Lee J.M. 1989; Pletnev A.G., 1990; Chambers T.J., 1990).

Гликопротеин NS1 может существовать в эукариотических клетках в трех формах: 1) внутриклеточной (Winkler G., 1989; Mackenzie J.M., 1996); 2) внеклеточной (Schlesinger J.J., 1990); 3) секретлируемой (Chambers T.J., 1990). Внутриклеточная форма NS1 существует в виде моно- и димеров, на поверхности клеток – в виде димеров, а внеклеточные формы белка представляют собой мультимерные комплексы (Ляпустин В.Н., 1987; Schlesinger J.J., 1990; Lee J.M., 1989; Crooks A.J., 1994). Было показано, что внутриклеточный NS1 связан с белками NS3, NS5, NS4A и двуцепочечной РНК в составе репликативного комплекса. Он необходим для синтеза минус-цепи РНК на ранней стадии репликации (Khromykh A.A., 2001; Muylaert I.R., 1996, 1997; Lindenbach B.D., 1997, 1999; Mackenzie J.M., 1996; Westaway E.O., 1997). Вследствие нахождения одной из форм гликопротеина NS1 на поверхности клетки-хозяина, данный белок является хорошим иммуногеном и вызывает активацию протективного гуморального иммунного ответа (Schlesinger J.J., 1990; Patarapotikul J., 1993). В настоящее время основной функцией белка NS1 считается взаимодействие с различными белками клетки-хозяина при репликации вируса, трансляции и продукции вирионов. Белок NS1 известен как активатор Toll-like рецепторов и ингибитор системы комплемента (Chen J., 2015; Avirutnan P., 2011; Rastogi M., 2016).

Белок NS2A является гидрофобным белком, он образуется в результате расщепления полипротеина неизвестным ферментом в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) (N-конец) и вирусной протеазой NS2B-NS3 в цитоплазме (С-

конец) (Füzik T., 2018; Chambers T.J., 1990; Falgout B., 1989, 1995). Белок NS2A играет важную роль в процессах сборки вирусных частиц, формирования индуцированных вирусом мембран и выходе вирионов из клетки (Kümmerer V.M., 2002; Liu W.J., 2003; Leung J.Y., 2008). Также предполагается его участие в транспорте РНК после репликации для сборки вирусных частиц (Liu W.J., 2003; Mackenzie J.M., 1998) и в процессе ингибирования действия интерферона (Muñoz-Jordan J.L., 2005; Liu W.J., 2004, 2006).

Белок NS2B в клетке существует в виде мембраносвязанного белка. Он образуется в результате расщепления полипротеина вирусной протеазой NS2B-NS3 (Perera R., 2008). Этот белок формирует комплекс с белком NS3, обеспечивая ему правильную конформацию за счет водородных связей. Белок NS2B выступает в качестве кофактора вирусной сериновой протеазы NS2B-NS3 (Perera R., 2008; Falgout B., 1991; Chambers T.J., 1993). Было установлено, что белок NS2B, аналогично белку NS2A локализован в местах синтеза вирусной РНК и способен к взаимодействию с белком NS5 и с 3'-нетранслируемой областью, что предполагает его участие в репликации вирусного генома (Westaway E.O., 1997; Mackenzie J.M., 1998; Chambers T.J., 1993).

Второй по величине вирусный **белок NS3**, является центральным ферментом для репликации вируса и процессинга полипротеина. Его консервативные области выполняют функции сериновой протеазы, геликазы и РНК-нуклеозидтрифосфатазы. Протеазный домен, расщепляющий пептидные связи между NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A и NS4B-NS5 локализован в N-конце белка NS3. Его протеазная активность проявляется только совместно с белком NS2B. Было обнаружено, что мутации, картированные в непосредственной близости от активного сайта протеазы NS2B-NS3, могут влиять на нейропатогенность ВКЭ (Růžek D., 2008).

С-концевой участок белка NS3 обладает геликазной активностью, используя энергию, высвобождаемую АТФ для раскручивания дуплексов РНК. К потенциальным функциям белка NS3 относят: устранение сложных вторичных структур вирусной РНК и/или разрешение дуплексов РНК,

формирующихся при репликации. С-концевой участок также обладает активностями РНК-трифосфатазы и 5'РНК-фосфатазы (Růzek D., 2008).

Белки NS4A и **NS4B** - это небольшие гидрофобные белки, которые являются частью репликативного комплекса. С- и N- концы белка NS4A располагаются в цитоплазме, они образуются путем отщепления короткого пептида 2К с помощью вирусной сериновой протеазы (Lindenbach B.D., 1999). За счет связи с белками NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS5 белок NS4A обеспечивает мембранную локализацию репликативного комплекса (Lindenbach B.D., 1999; Westaway E.O., 1997; Mackenzie J.M., 1998; Ambrose R.L., 2011). В зараженных вирусом клетках белок NS4B локализован вместе с белком NS3 в перинуклеарном пространстве, взаимодействуя с ним, он оказывает влияние на репликацию вируса. Белок NS4B диссоциирует вирусную хеликазу NS3 с одноцепочечной РНК, в результате чего происходит усиление хеликазной активности NS3 (Umareddy I., 2006).

Белок NS5 является самым большим (100 кДа) и наиболее высококонсервативным вирусным белком, служащим вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (Muñoz-Jordan J.L., 2003). Вместе с другими вирусными (NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B) и некоторыми клеточными белками белок NS5 участвует в формировании репликативного комплекса (O'Reilly E.K., 1998; Chen C.J., 1997; DeNova-Ocampo M., 2002). Было установлено, что белок NS5 флавивирусов, также как и NS4B, может влиять на индукцию иммуномедиаторов. Он способен ингибировать действие интерферона путем блокирования компонентов сигнальных путей (Best S.M., 2005; Lin R.J., 2006; Werme K., 2008).

1.3. Характеристика Европейского субтипа вируса клещевого энцефалита

Как уже упоминалось в данной главе, в настоящее время выделяют три основных субтипа ВКЭ: европейский (ВКЭ-ЕС), дальневосточный (ВКЭ-ДВ) и сибирский (ВКЭ-Сиб) (Ecker M., 1999; Gould E.A., 2001; King A.M.Q., 2012; <https://talk.ictvonline.org/>).

Каждый из субтипов ВКЭ имеет собственный ареал, ассоциирован с определенным видом клеща-переносчика и кругом позвоночных хозяев, обладает разным патогенным потенциалом для человека (Савинова Ю.С., 2021).

Зоной абсолютного доминирования ВКЭ-ЕС являются Центральная и Северная Европа, причем западная граница ее находится на территории Беларуси, Украины и скандинавских стран (Савинова Ю.С., 2021). Восточнее, на европейской территории России, Урале, в Западной и Восточной Сибири отмечается совместная циркуляция ВКЭ-ЕС и ВКЭ-Сиб, при этом ВКЭ-ЕС встречается, как правило, в минорных количествах (Савинова Ю.С., 2021). Крайней восточной точкой ареала, где на сегодняшний день выявлен ВКЭ-ЕС, является Южная Корея (Kim S.Y., 2008; Yun S.M., 2011, 2012).

На основании изучения источников научной литературы, нами составлена карта, демонстрирующая встречаемость различных субтипов ВКЭ на территории Европы (Рис. 1.6).



Рисунок 1.6 - Распространение различных субтипов ВКЭ на территории Европы.

Примечание: ★ - ВКЭ-ЕС; ★ - ВКЭ-Сиб; ★ - ВКЭ-ДВ.

В большинстве стран Европейского ареала вируса встречается только один субтип - ВКЭ-ЕС (Табл. 1.2). Совместная циркуляция нескольких субтипов ВКЭ выявлена только в нескольких странах Северной Европы. Например, на территории Латвии и Эстонии изолированы штаммы ВКЭ всех трех субтипов (европейского, сибирского, дальневосточного).

Таблица 1.2 - Информация о наличии заболеваемости клещевым энцефалитом в различных европейских и азиатских странах и циркулирующих субтипах вируса (Dobler G., 2019)

Страна	Наличие заболеваемости	Встречающиеся субтипы ВКЭ
Австрия	+	ЕС
Болгария	спорадические случаи	ЕС
Босния и Герцеговина	единичные случаи	ЕС, СС
Великобритания	единичные случаи	ЕС
Венгрия	+	ЕС
Германия	+	ЕС
Греция	2 случая	нет информации
Дания	+	ЕС
Италия	+	ЕС
Казахстан	+	ЕС, СС
Китай	+	ДВ
Латвия	+	ЕС, СС, ДВ
Литва	+	ЕС
Молдова	-	ДВ
Монголия	+	ДВ,
Нидерланды	единичные случаи	ЕС
Норвегия	+	ЕС
Польша	+	ЕС
Республика Беларусь	+	ЕС
Россия	+	ЕС, СС, ДВ
Румыния	спорадическая заболеваемость	ЕС, возможно ДВ
Сербия	спорадическая заболеваемость	ЕС
Словакия	+	ЕС
Тунис	единичный случай	ЕС
Словения	+	ЕС
Украина	спорадическая заболеваемость	ЕС, СС, ДВ
Финляндия	+	ЕС, СС
Франция	+	ЕС
Хорватия	+	ЕС
Чешская Республика	+	ЕС

Швейцария	+	ЕС
Швеция	+	ЕС
Эстония	+	ЕС, СС, ДВ
Южная Корея	+	ЕС
Япония	единичные случаи	ДВ

Примечание: + - наличие случаев заболевания КЭ

В Финляндии обнаружены два субтипа вируса - ВКЭ-ЕС и ВКЭ-Сиб. На территории Юго-Восточной Европы в Боснии и Герцеговине также выявлена одновременная циркуляция ВКЭ-ЕС и ВКЭ-Сиб (Савинова Ю.С., 2021). В Украине кроме штаммов ВКЭ-ЕС изолированы штаммы ВКЭ-Сиб и ВКЭ-ДВ. Согласно исследованиям, проведенным в 2018-2019 гг., были получены первые свидетельства присутствия ВКЭ в Великобритании. Первый случай обнаружения ВКЭ в Великобритании был зафиксирован в 2018 г. Вирус был обнаружен в иксодовых клещах, собранных в районе Тетфорд-Форест в Восточной Англии. Анализ нуклеотидной последовательности штамма *TBEV-UK-Thetford* показал, что он генетически очень схож со штаммом из Норвегии *Mandal-2009*. Второе обнаружение ВКЭ в Великобритании было в клещах на границе Хэмпшира и Дорсета на юге Англии. Этот штамм отличался от *TBEV-UK-Thetford*, но был гомологичен штамму *TBEV-NL-Salland*, выявленному в Нидерландах в 2017 г.

На территории России картина географического распространения субтипов ВКЭ крайне неравномерна и более разнообразна (Табл. 1.3, Рис. 1.7).

По данным референс-центра по мониторингу за клещевым вирусным энцефалитом при ФКУЗ Иркутский НИПЧИ Роспотребнадзора, дополненных результатами собственных исследований (Савинова Ю.С., 2021) и данными, полученными при анализе научной литературы, ВКЭ-ЕС встречается в 16 субъектах Российской Федерации (Андаев Е.И., 2019).

В европейской части России он обнаружен на территории Калининградской, Ленинградской, Калужской, Московской, Вологодской областей, Пермского края, в Республиках Карелия, Удмуртия и Крым. Циркуляция данного варианта ВКЭ выявлена и в азиатской части России (Тюменская, Омская, Новосибирская и

Иркутская области, Республики Алтай и Бурятия, Алтайский край). ВКЭ-ЕС не обнаружен в Забайкальском крае и на Дальнем Востоке (Савинова Ю.С., 2021).

Таким образом, исходя из анализа имеющихся на сегодняшний день данных географического распространения различных субтипов ВКЭ, нами сделан вывод, что, восточной границей ареала ВКЭ-ЕС в России является Восточная Сибирь (Республика Бурятия) (Верхозина М.М., 2017).

Таблица 1.3 - Генетические варианты ВКЭ, циркулирующие в природных очагах на территории различных субъектов Российской Федерации

№ п/п	Субъект РФ	Субтип ВКЭ			
		ВКЭ-ЕС	ВКЭ-ДВ	ВКЭ-Сиб	ВКЭ-БК
1.	Калининградская область	+	+	+	-
2.	Архангельская область	-	-	+	-
3.	Республика Карелия	+	-	-	-
4.	Псковская область	-	+	-	-
5.	Ленинградская область	+	-	+	-
6.	Новгородская область	-	+	+	-
7.	Калужская область	+	-	+	-
8.	Ярославская область	-	+	+	-
9.	Московская область	+	-	-	-
10.	Вологодская область	+	+	+	-
11.	Республика Крым	+	+	+	-
12.	Кировская область	-	-	+	-
13.	Удмуртская Республика	+	-	+	-
14.	Республика Коми	-	+	+	-
15.	Пермский край	+	+	+	-
16.	Республика Башкортостан	-	+	+	-
17.	Свердловская область	-	+	+	-
18.	Челябинская область	-	-	+	-
19.	Курганская область	-	+	+	-
20.	Тюменская область	+	-	+	-
21.	Новосибирская область	+	+	+	+
22.	Томская область	-	+	+	-
23.	Кемеровская область	-	+	+	-
24.	Республика Алтай	+	-	+	-
25.	Алтайский край	+	-	+	-
26.	Республика Хакасия	-	+	+	-
27.	Омская область	+	+	+	-
28.	Республика Тыва	-	-	+	-
29.	Красноярский край	-	-	+	-
30.	Иркутская область	+	+	+	+
31.	Республика Бурятия	+	+	+	+
32.	Забайкальский край	-	+	+	+
33.	ЕАО	-	+	-	-

34.	Амурская область	-	+	+	-
35.	Приморский край	-	+	+	-
36.	Хабаровский край	-	+	+	-
37.	Сахалинская область	-	+	+	-



Рисунок 1.7 - Географическое распространение субтипов ВКЭ на территории России.

В настоящее время случаи КЭ официально зарегистрированы в 27 европейских странах: Австрии, Беларуси, Болгарии, Боснии и Герцеговине, Венгрии, Германии, Греции, Дании, Италии, Латвии, Литве, Нидерландах, Норвегии, Польше, Румынии, России, Сербии, Словакии, Словении, Финляндии, Франции, Хорватии, Чехии, Швейцарии, Швеции, Эстонии, Украине (Dobler G., 2019).

При этом заболеваемость КЭ на территории Европы распределена неравномерно (Рис. 1.8). Наибольшее количество заболеваний отмечается в Чехии (среднегодовое число заболеваний – около 600), Латвии (примерно 430 в год), Литве (около 400 в год), Германии (приблизительно 280 в год), Словении и Польше (приблизительно 230 случаев в год) (Dobler G., 2019). Как правило, все случаи заболеваний людей КЭ в Европе этиологически связаны с ВКЭ-ЕС. Случаи КЭ с более тяжелым течением заболевания выявлены в Финляндии на архипелаге Котка, но они были вызваны ВКЭ-Сиб (Kuivanen S., 2015). В Латвии, где регистрируется высокий уровень заболеваемости КЭ, наряду с ВКЭ-ЕС подтверждена циркуляция ВКЭ-Сиб и ВКЭ-ДВ.

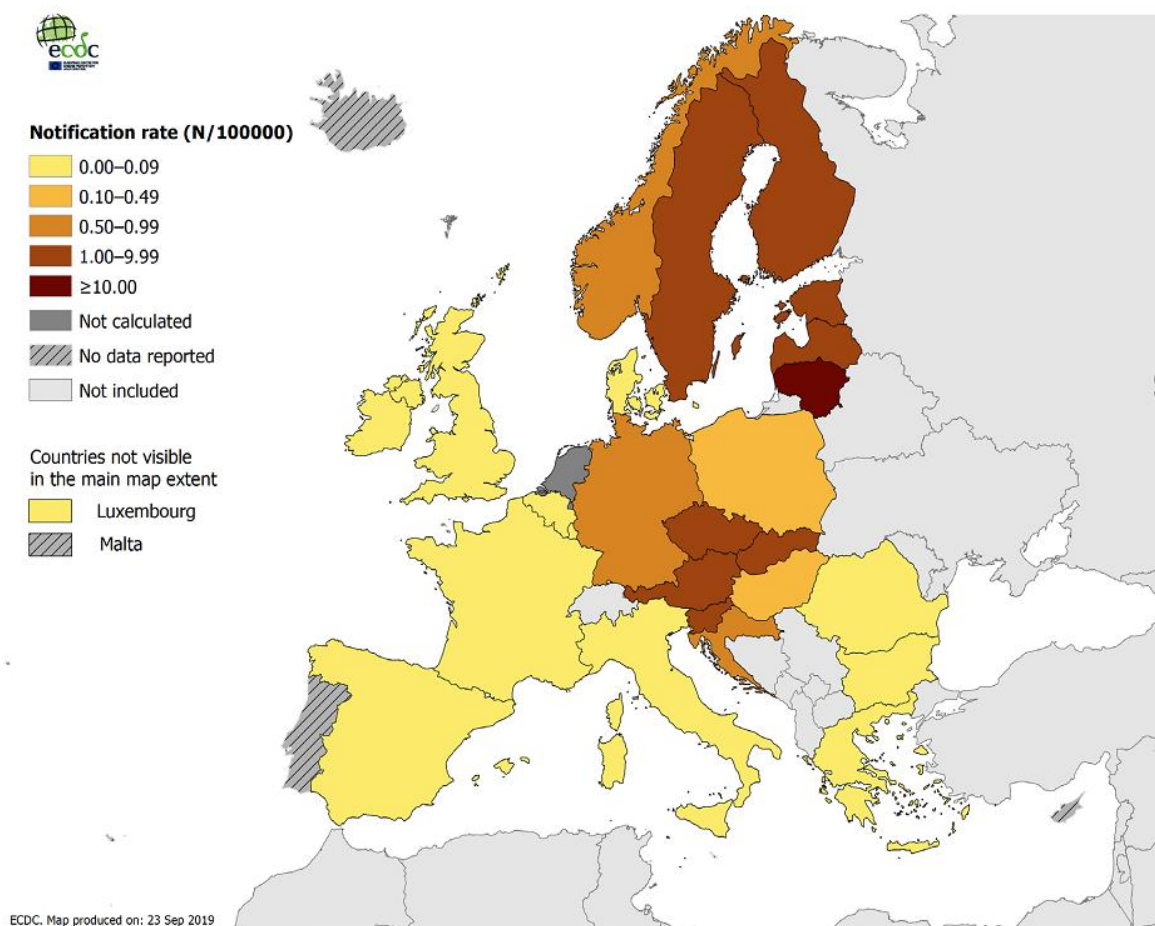


Рисунок 1.8 - Заболеваемость клещевым энцефалитом в 2018 г. в Европейском союзе и Странах Европейского экономического пространства (на 100 000 населения) [Tick-borne encephalitis. Annual Epidemiological reports for 2018].

Самые высокие показатели заболеваемости КЭ регистрируются в России, здесь же зафиксирована самая высокая генетическая вариабельность ВКЭ. В Бельгии, Боснии и Герцеговине, Греции, Нидерландах, Сербии, Украине и Хорватии, отмечаются только спорадические случаи КЭ. В Южной Корее, на территории которой были изолированы только штаммы ВКЭ-ЕС, случаев КЭ среди людей не зарегистрировано.

В сентябре 2020 г. исследователями были опубликованы данные, в которых был описан первый случай заболевания человека КЭ на территории Испании (Camprubi D., 2020).

Значительный научный интерес вызывают данные, описывающие единственный случай заболевания человека КЭ на территории Африканского континента (FaresW., 2021). Проведенный авторами филогенетический анализ штамма, выделенного в Тунисе, показал, что он принадлежит к ВКЭ-ЕС. Авторы отметили, что все последовательности штаммов ВКЭ-ЕС в пределах Европы были генетически очень близки друг к другу (уровень различий от 0-3,7%), в то время как тунисский штамм значительно от них отличался (уровень различий - 6-8,3%). Высокий уровень отличий штамма из Туниса и европейских штаммов авторы объясняют сильной генетической дифференциацией между евразийскими и северо-африканскими популяциями *I. ricinus* (DeMeeûs С., 2002; Noureddine R., 2011). Все вышеописанные случаи свидетельствуют о том, что ВКЭ в настоящее время выходит за пределы существующей географии (FaresW., 2021).

По сравнению с КЭ, вызванным ВКЭ-Сиб и ВКЭ-ДВ, ВКЭ-ЕС, как правило, вызывает заболевание с более мягким течением и благоприятным исходом, (Dobler G., 2019; Злобин В.И., 1996; Вотяков В.И., 2002; Zajkowska J., 2013; Bogovic P., 2015; Ruzek D., 2019). У 74–85% пациентов, инфицированных ВКЭ-ЕС, наблюдается двухфазное течение заболевания. В Европе КЭ основной формой заболевания является лихорадочная, очаговые формы регистрируются редко. Клиническая картина инфекции варьирует от субклинической формы до случаев КЭ с поражением ЦНС с тяжелыми и длительно сохраняющимися

после заболевания неврологическими последствиями (до 10% случаев). Показатель летальности от ВКЭ-ЕС в среднем не превышает 2% (Gritsun T.S., 2003; Lindquist L., 2008; Kaiser R., 2012; Borde J.P., 2017).

В ежегодном эпидемиологическом отчете по заболеваемости КЭ, опубликованном ECDC в 2018 г., указано, что уровень смертности в Европе в отчетном году составил около 0,2% (1908 подтвержденных случаев КЭ, из них пять летальных исходов). Как правило, для западного КЭ не характерны геморрагические проявления инфекции и хроническое (прогредиентное) течение, которые обычно ассоциируют с другими субтипами вируса. Смертельные случаи в основном регистрируются у пожилых людей или пациентов с ослабленным иммунитетом (Dobler G., 2019b).

В экспериментах на овцах было показано, что западный КЭ при естественном заражении через клещей и при подкожном инфицировании, не проходит через ГЭБ (Вотяков В.И., 2002). В результате более чем 25-летних сравнительных комплексных исследований клинической картины и закономерностей развития инфекционного процесса при западном и восточном КЭ на территории Белоруссии и Дальнего Востока В.И. Вотяковым, В.М. Ждановым и И.И. Протас выявлены качественные клиничко-патогенетические различия этих заболеваний. Исследователи пришли к выводу, что западный и восточный КЭ являются самостоятельными нозологическими единицами (Вотяков В.И., 2002). На основании полученных данных Вотяков В.И. сформулировал гипотезу, согласно которой различают: 1) клещевой вирусный энцефаломиелит, связанный с дальневосточным подтипом вируса, 2) клещевой вирусный серозный менингит при заражении западным подтипом и 3) клещевой вирусный менингоэнцефалит, связанный с сибирским подтипом (Вотяков В.И., 2002). Многолетняя дискуссия по этому поводу продолжается до сих пор. В Международную классификацию болезней МКБ-10 введены разные пункты для кодирования КЭ: А.84.0 – дальневосточный клещевой энцефалит (русский весенне-летний энцефалит) и А84.1 центральноевропейский клещевой энцефалит.

При изучении вирулентности ВКЭ-ЕС было показано, что штамм *MucAr NB171/11* проявляет низкую нейрпатогенность и не обладает нейроинвазивностью. Чешский штамм *ts263*, является термочувствительным штаммом, который некультивируется при температуре 40°C, а также не проявляет нейроинвазивности (Dobler G., 2019).

Основным переносчиком ВКЭ-ЕС в Европе, а также его резервуарным хозяином является клещ *Ixodes ricinus*. За пределами основного европейского ареала, на территории Восточной и Западной Сибири штаммы ВКЭ-ЕС были изолированы от клещей *I. persulcatus* (Савинова Ю.С., 2021). В таежных клещах ВКЭ-ЕС был также обнаружен на территории Финляндии (Jaaskelainen A.E., 2011). ВКЭ-ЕС также был детектирован и в других видах клещей родов *Ixodes* (*I. pavlovskyi*, *I. trianguliceps*, *I. gibbosus*, *I. nipponensis*), *Dermacentor* (*D. marginatus*, *D. reticulatus*, *D. pictus*), *Haemaphysalis* (*H. concinna*, *H. flava*, *H. longicornis*) и *Hyalomma* (*H. marginatum*) (Ko S., 2010; Yun S.M., 2012; Yurchenko O.O., 2017; Chitimia-Dobler L., 2019; Im J.H., 2019). Например, в восточной Польше ВКЭ-ЕС был обнаружен в *D. reticulatus* (Wojcik-Fatla A., 2011).

Компетентными резервуарными хозяевами, которые играют ключевую роль в передаче ВКЭ, в том числе ВКЭ-ЕС, являются представители отрядов Грызуны (*Rodentia*) и Насекомоядные (*Eulipotyphla*). В электронной базе данных NCBI имеются депонированные нуклеотидные последовательности штаммов ВКЭ-ЕС, выделенных на территории Европы от рыжей полевки (KC835597), лесной мыши, обыкновенной белки, желтогорлой мыши (KF151173). Achazi K. и соавт. сообщали о выявлении ВКЭ-ЕС от шести видов грызунов: полевой желтогорлой, лесной мышей, темной, обыкновенной и рыжей полевок (Achazi K., 2011). В коллекции нашего центра имеются штаммы ВКЭ-ЕС из Белоруссии, изолированные от рыжей полевки, желтогорлой мыши, бурозубки. На территории Южной Кореи изоляты ВКЭ-ЕС были выделены от полевой мыши (*Apodemu sagrarius*) (Yun S.M., 2008; Kim S.Y., 2008).

ВКЭ-ЕС также изолировали от представителей отрядов *Lagomorpha* (Зайцеобразные), *Carnivore* (Плотоядные) и *Artiodactyla* (Парнокопытные) (Табл. 1.4).

Таблица 1.4 - Спектр позвоночных хозяев, в которых детектирован ВКЭ европейского субтипа*

Порядок\ Семейство	Вид
Мышиные (Muridae)	<i>желтогорлая мышь (Apodemus flavicollis)</i>
	<i>европейская или лесная (Apodemus sylvaticus)</i>
	<i>полевая мышь (Apodemus agrarius)</i>
Хомяковые (Cricetidae)	<i>темная полевка (Microtus agrestis)</i>
	<i>обыкновенная полевка (Microtus arvalis)</i>
	<i>узкочерепная или стадная полевка (Microtus gregalis)</i>
	<i>полевка экономка (Microtus oeconomus)</i>
	<i>рыжая полевка (Myodes glareolus)</i>
Беличьи (Sciuridae)	<i>белка обыкновенная (Sciurus vulgaris)</i>
Мышовковые (Dipodidae)	<i>лесная мышовка (Sicista betulina)</i>
Ежовые (Erinaceidae)	<i>восточноевропейский еж (Erinaceus concolor)</i>
	<i>южный еж (Erinaceus romanicus)</i>
Кротовые (Talpidae)	<i>европейский или обыкновенный крот (Talpa europea)</i>
Хищные (Carnivora)	
Псовые (Canidae)	<i>обыкновенная или рыжая лисица (Vulpes vulpes)</i>
Куницы (Mustelidae)	<i>лесной хорек (Mustela putorius)</i>
Оленевые (Cervidae)	<i>благородный олень (Cervus elephus)</i>
	<i>европейская косуля (Capreolus capreolus)</i>
	<i>лось (Alces alces)</i>
Полорогие (Bovidae)	<i>зубр (Bison bonasus)</i>
	<i>козы (Caprasp), включая молоко</i>
	<i>овцы (Ovisaries), включая молоко</i>
Птицы (Aves) (families)	семейство <i>Passeriformes</i> (отряд Воробьинообразных) и др.

*Примечание:** - цитируется по (Chitimia-Dobler L., 2019).

В коллекции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ имеется штамм ВКЭ-ЕС, выделенный в 1988 г. из молока козы (Республика Беларусь, Могилевская область).

Важную роль в резервации ВКЭ, а также в его переносе на дальние расстояния играют птицы. ВКЭ был изолирован от многих видов птиц, изолированных главным образом от птиц из отряда Воробьинообразных. Вирус изолировали от дрозда-белобровика (*Turdus iliacus*), дрозда-рябинника (*Turdus pilaris*) и других *Turdus* spp., обыкновенного скворца (*Sturnus vulgaris*), галки (*Corvus monedula*), черной вороны (*Corvus corone*), сороки (*Pica pica*), обыкновенного жулана (*Lanius collurio*), лесного конька (*Anthus trivialis*), юрка

(*Fringilla montifringilla*), зяблика (*Fringilla coelebs*), обыкновенного клеста (*Loxia curvirostra*), чечетки (*Carduelis flammea*), белой и желтой трясогузок (*Motacilla alba*, *Motacilla flava*), овсянковых (*Emberiza spp.*), обыкновенной вертишейки (*Jynx torquilla*), каростели (*Crex Crex*), вальдшнепа (*Scolopax rusticola*), рябчика (*Bonasa Bonasia*), морянки (*Clangula hyemalis*), турпана (*Melanitta fusca*), лысухи (*Fulica atra*), чирка трескунка (*Anas querquedula*), канюка обыкновенного (*Buteo buteo*) (Hubálek Z., 2012; Lommano E., 2014; Csank T., 2016).

В коллекции нашего Центра имеются штаммы ВКЭ-ЕС, изолированные в Белоруссии от сороки (*Pica pica*) и сизого голубя (*Columba livia*).

В Евразии ВКЭ-ЕС циркулирует на территориях, значительно различающихся по климатическим условиям, рельефу, ландшафту, характеристикам биотопов. Учитывая тот факт, что основными переносчиками ВКЭ-ЕС являются клещи *I. ricinus*, которые в Европе обитают, в первую очередь, в районах с лиственными и смешанными лесами, именно из этих биотопов чаще изолируют данный субтип вируса (Савинова Ю.С., 2021).

Важную роль в распределении иксодовых клещей, а, следовательно, и инфицирующих их возбудителей может играть высота местности над уровнем моря. Очаги КЭ с циркуляцией в них ВКЭ-ЕС, как правило, расположены на высоте, не превышающей 1000 м над уровнем моря. В последние десятилетия в ряде европейских стран отмечаются изменения географического распространения клещей *I. ricinus*. Они все чаще выявляются в высокогорных районах и в северных широтах. Например, в Чехии *I. ricinus* был обнаружен исследователями на высоте 1100 метров над уровнем моря (Danielova V., 2010). В австрийских Альпах были зафиксированы случаи КЭ человека на высоте более 1500 метров, они были связаны с употреблением непастеризованного козьего молока (Holzmann H., 2014). На юго-западе Швейцарии в кантоне Вале стабильная популяция *I. ricinus* была найдена на высоте 1450 метров над уровнем моря (Cotty A., 1986). Приведенные нами данные свидетельствуют в пользу того, что с изменением местообитания основного переносчика ВКЭ-ЕС

клещей *I. ricinus*, может расширяться и диапазон высот, на которых встречается данный субтип вируса.

1.4. Вопросы дивергенции и эволюции вируса клещевого энцефалита

На сегодняшний день в отечественной и зарубежной литературе продолжается дискуссия о времени дивергенции различных субтипов ВКЭ. Одной из первых публикаций, в которой дан развернутый сценарий эволюционных событий, связанных с происхождением и распространением ВКЭ, стала работа Zanotto P.M. et al. (Zanotto P.M., 1995). Авторами была высказана гипотеза клинального распространения ВКЭ по Евразийскому континенту в направлении с востока на запад. Позднее D.M. Heinze et al. провели ревизию клинальной концепции эволюции ВКЭ. Основываясь на Байесовском методе статистики, авторы предположили, что ВКЭ отделился от общего предка, который возник около 3100 лет назад, и затем распространялся из единой точки (центральная часть РФ) в двух направлениях – на запад (западная группа) и на восток Северной Евразии (восточная группа) (Рис. 1.9) (Heinze D.M., 2012).

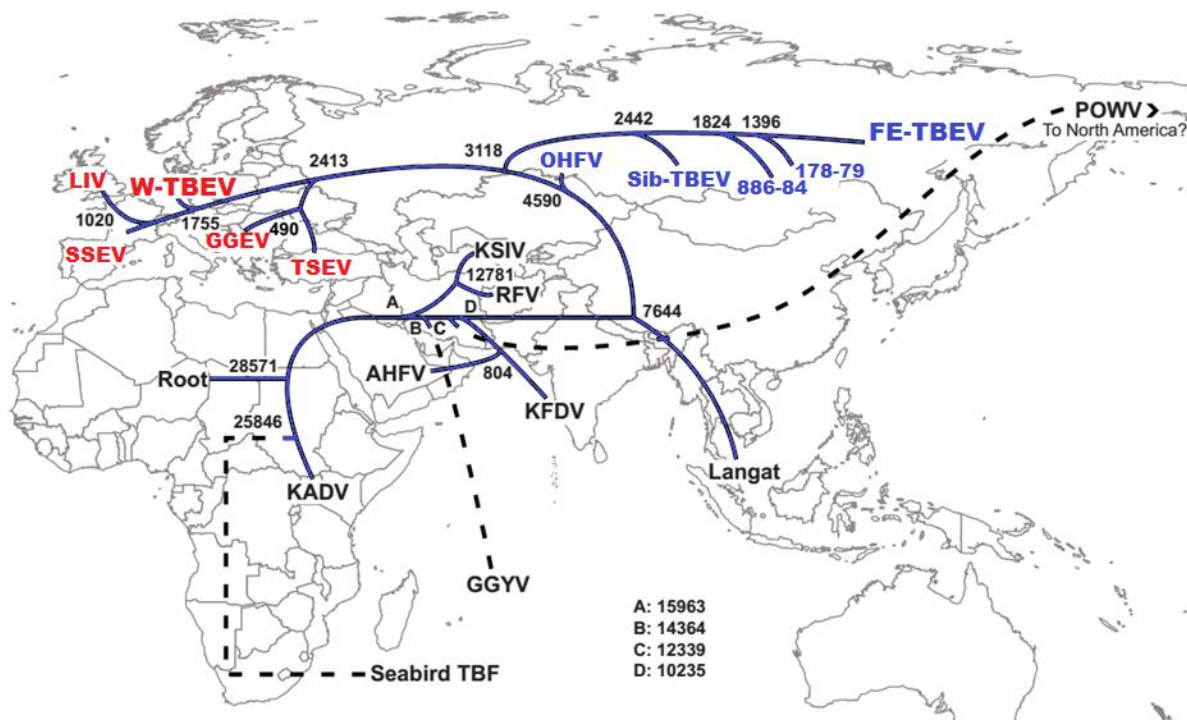


Рисунок 1.9 - Возможная модель распространения ВКЭ на территории Евразии (Heinze D.M., 2012).

Было показано, что в родословной ВКЭ между группами западного и восточного КЭ имеется глубокий раскол. К западной группе авторами были отнесены вирусы энцефалитов овец и ВКЭ-ЕС. В восточную группу вошли ВКЭ-Сиб и ВКЭ-ДВ. В западной группе первыми от общего предка отделились вирус греческого козьего энцефалита (GGEV) и вирус турецкого энцефалита овец (TSEV), затем вирус испанского энцефалита овец (SSEV) и шотландского энцефалита овец (вирус Louping ill, LIV). ВКЭ-ЕС дивергировал от общего предка западной группы около 1755 лет назад.

Одним из интереснейших в области эволюции ВКЭ является исследование Moureaux G. и соавт., проведенное с использованием Байесовского филогенетического метода. Авторы показали, что предок ВКЭ-ЕС разошелся с общим предком остальных субтипов TBEV приблизительно 1087 лет назад (с 95% доверительным интервалом (ДИ) от 649 до 1610 лет). Предок ВКЭ-ЕС дал начало вирусу LIV приблизительно 572 года тому назад (с 95% ДИ от 328 до 844 лет). Далее Louping ill вирус мигрировал на территорию Британских

островов, где он в последующем эволюционировал. Приблизительно в этот же период от этой группы вирусов отделился GGEV, вирус TSEV и SSEV, которые мигрировали на Балканские и Пиренейский острова. Разделение ВКЭ-ДВ и ВКЭ-Сиб произошло около 900 лет тому назад (с 95% ДИ от 503 до 1508 лет). По данным этих исследователей ВКЭ-ЕС является самым молодым из трех известных субтипов. Данные полученные Weidmann M. и соавт., свидетельствуют о том, что ВКЭ-ЕС в Центральной Европе возник в Чешской Республике, откуда мигрировал в Германию около 350 лет тому назад (Weidmann M., 2013). Все известные в настоящее время штаммы ВКЭ-ЕС из Центральной Европы разделились всего около 300-400 лет назад. Но если для ВКЭ-Сиб характерна последовательная генетическая эволюция, то ВКЭ-ЕС, по всей видимости, происходит из одной генетической клады и показывает параллельную эволюцию. Исследования по конкретным очагам КЭ свидетельствуют, что в каждом из них распространен отдельный, четко идентифицируемый штамм вируса. На примере Финляндии (штамм *Kumlinge*) и Австрии (штамм *Zillertal*) установлено, что штаммы ВКЭ-ЕС могут быть, стабильны в последовательностях гена E в течение десятилетий.

Таким образом, осуществленный нами анализ научной литературы показал, что зоной доминирования ВКЭ-ЕС являются Центральная и Северная Европа. Циркуляция этого субтипа вируса также выявлена в России, Южной Корее и Северной Африке. В настоящее время наблюдается расширение ареала, рост числа стран в которых регистрируются случаи КЭ, увеличение уровня заболеваемости, зафиксированы случаи тяжелого течения КЭ, ассоциированные с данным вариантом вируса. Учитывая абсолютное доминирование ВКЭ-ЕС в Европе, его генетические, фенотипические и экологические свойства достаточно хорошо изучены в пределах основного ареала. Однако, в азиатской части России ВКЭ-ЕС выявлен относительно недавно и остается практически не исследованным. На территории Сибири данный субтип встречается в минорных количествах, он циркулирует в условиях значительно отличающихся по климато-географическим условиям от основного европейского ареала вируса.

В связи с этим, научный интерес представляет сравнительный анализ генетических и фенотипических свойств штаммов ВКЭ-ЕС из Европы и азиатской части России, выявление экологических особенностей циркуляции данного варианта вируса на территории Сибири, реконструкция его эволюционной истории.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы исследования:

2.1.1. Штаммы вируса клещевого энцефалита

В работе использовано 14 штаммов ВКЭ из коллекции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (№478258 скр.rf.ru). Штаммы ВКЭ были изолированы на территории Восточной и Западной Сибири с 1971 по 1998 гг. (Табл. 2.1). После 2-3-х пассажей в мозге мышей-сосунков или пассирования в культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ), штаммы ВКЭ были лиофилизированы и до использования в работе хранились в холодильнике при температуре -20°C. Непосредственно перед началом исследований штаммы восстанавливали путем внутримозгового заражения белых мышей весом 5-7 г.

2.1.2. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности штаммов ВКЭ-ЕС

В ходе исследования были определены полные геномы пяти штаммов ВКЭ-ЕС из Восточной Сибири и трех штаммов из Западной Сибири (Табл. 2.1). Кроме того в изучаемую выборку были включены последовательности полипротеина штаммов из Восточной Сибири - *IrkutskBR99-08* (KP331441), *IrkutskBR1456-09* (KP331443), *IrkutskBR1434-09* (KP331442), *Sorex 18-10* (№ доступа GenBank KP938507) и штамма 84.2 из Алтая (HM120875), а также все доступные на момент начала наших исследований полногеномные последовательности ВКЭ-ЕС в международной электронной базе данных GenBank.

Таблица 2.1- Сведения о штаммах вируса клещевого энцефалита европейского субтипа из коллекции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ

№	Наименование штамма	Год изоляции	Источник изоляции	Район изоляции
Восточная Сибирь				
1.	118-71*	1971	суслик длиннохвостый (<i>Spermophilus undulatus</i>)	Иркутская область, Эхирит-Булагатский район, с. Олой
2.	134-71	1971	суслик длиннохвостый (<i>Spermophilus undulatus</i>)	-//-
3.	126-71*	1971	<i>I. persulcatus</i>	-//-
4.	157-74	1974	<i>I. persulcatus</i>	-//-
5.	163-74*	1974	<i>I. persulcatus</i>	-//-
6.	262-74*	1974	<i>I. persulcatus</i>	-//-
7.	272-75	1975	полевка узкочерепная (<i>Microtus gregalis</i>)	-//-
8.	898-84	1984	красная полевка (<i>Myodes rutilus</i>)	Иркутская область, Эхирит-Булагатский район, с. Красный Яр
9.	1 Г-98*	1998	сгусток крови больного КЭ человека	Иркутская область, Иркутский район, Байкальский тракт
Западная Сибирь				
1.	Змеиногорск-1*	1986	<i>I. persulcatus</i>	Змеиногорский район Алтайского края
2.	Змеиногорск-3	1986	<i>I. persulcatus</i>	-//-
3.	Змеиногорск-5*	1986	<i>I. persulcatus</i>	-//-
4.	Змеиногорск-7	1986	<i>I. persulcatus</i>	-//-
5.	Змеиногорск-9*	1986	<i>I. persulcatus</i>	-//-

Примечание:* - отмечены штаммы, полные геномы которых были расшифрованы в ходе исследования

Таблица 2.2 - Сведения о штаммах вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, полные геномы которых исследовались в работе

Номер № (Genbank)	Наименование штамма	Страна	Источник изоляции	Год изоляции
KJ000002	Absettarov	Россия	кровь человека	1951
U39292	Нурр	Чехия	кровь человека	1953
KJ922512	Kubinova	Чехия	кровь человека	1953
KJ922513	Petracova	Чехия	кровь человека	1953
KJ922514	Skrivanek	Чехия	кровь человека	1953
KJ922515	Tobrman	Чехия	кровь человека	1953
KJ922516	Vlasaty	Чехия	кровь человека	1953
GU183380	KumlingeA52	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	1959
KT224357	Kumlinge	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	1959

GU183381	Joutseno	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	1960
U27495	Neidoerfl	Австрия	<i>I. ricinus</i>	1971
AM600965	K23	Германия	<i>I. ricinus</i>	1975
KC835595	114	Словакия	<i>I. ricinus</i>	1980
U27491	263	Чехия	<i>I. ricinus</i>	1987
KC835597	CGI223	Словакия	<i>Myodes glareolus</i>	1990
KC835596	285	Словакия	<i>I. ricinus</i>	1990
KF151173	A104	Австрия	<i>Apodemus flavicollis</i>	1990
JQ654701	Ljubljana	Словения	кровь человека	1992
GU183383	Est3476	Эстония	кровь человека	2000
GU183379	Kumlinge 25-03	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2003
GQ266392	AS33	Германия	<i>I. ricinus</i>	2005
MK801803	Isosaari 5	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2005
FJ572210	Salem	Германия	кровь <i>Macaca sylvanus</i>	2006
HM535610	KrM 213	Южная Корея	<i>Apodemus agrarius</i>	2006
HM535611	KrM 93	Южная Корея	<i>Apodemus agrarius</i>	2006
HM120875	84.2	Россия (Западная Сибирь)	<i>I. persulcatus</i>	2007
KX966398	JP 296	Швеция	<i>I. ricinus</i>	2008
KX96639	JP 554	Швеция	<i>I. ricinus</i>	2008
KP331441	IrkutskBR_99-08	Россия (Восточная Сибирь)	<i>I. persulcatus</i>	2008
KF991106	Saringe 2009	Швеция	<i>I. ricinus</i>	2009
KF991106	Mandal	Швеция	<i>I. ricinus</i>	2009
MN735991	DEN09 Tokkekoeb	Дания	<i>I. ricinus</i>	2009
KP331442	IrkutskBR_1434-09	Россия (Восточная Сибирь)	<i>I. persulcatus</i>	2009
KP331443	IrkutskBR_1456-09	Россия (Восточная Сибирь)	<i>I. persulcatus</i>	2009
KP938507	Sorex 18-10	Россия (Восточная Сибирь)	<i>Sorex</i> sp.	2010
MG210945	KEM 118	Венгрия	<i>I. ricinus</i>	2011
MG210946	KEM 125	Венгрия	<i>I. ricinus</i>	2011
MG210947	KEM 127	Венгрия	<i>H. concinna</i>	2011
MG210948	KEM 168	Венгрия	<i>I. ricinus</i>	2011
MK801804	Sipoo 4	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2013
MK801805	Sipoo 8	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2013
MK801806	Sipoo 12	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2013
MK801807	Sipoo 22	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2013
MK801808	Sipoo 23	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2013
MG589937	Kuutsalo Human 2015	Финляндия	кровь человека	2015
LC171402	NL	Нидерланды	<i>I. ricinus</i>	2016

MN021184	NL-UH	Нидерланды	<i>I. ricinus</i>	2016
MG589938	Kuutsalo 14	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2017
MK801809	E266-Espoo-Finland-2017	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2017
MK922615	HB IF06 -8033	Германия	<i>I. ricinus</i>	2018
MK922616	HB IF06 -8040	Германия	<i>I. ricinus</i>	2018
MK922617	Rauher BuschP19-S40	Германия	<i>I. ricinus</i>	2018
MK801810	K12 Espoo	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2018
MK801811	K13 Espoo	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2018
MK801812	K14 Espoo	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2018
MK801813	K15 Espoo	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2018
MK801814	K16Espoo	Финляндия	<i>I. ricinus</i>	2018
MN128700	UK-Thetford Forest 2018	Великобритания	<i>I. ricinus</i>	2018
MN735988	DEN19 S3A Tisvilde	Дания	<i>I. ricinus</i>	2019
MN735989	DEN19 S3 Tisvilde	Дания	<i>I. ricinus</i>	2019
MN735990	DEN19 S4A Tisvilde	Дания	<i>I. ricinus</i>	2019
MN661145	UK-Hampshire	Великобритания	<i>I. ricinus</i>	2019
MT581212	93/783	Швеция	кровь человека	2019

Кроме полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС при построении филогенетического дерева в главе 3 в анализ были взяты последовательности штаммов других субтипов вируса, а также, депонированных в электронную базу данных GenBank (n=190) (Табл. 2.3).

Таблица 2.3 - Основные сведения о типовых штаммах других субтипов ВКЭ и некоторых представителей флавивирусов, переносимых клещами, взятых в исследование

Вид вируса	Субтип	Типовой штамм	№ в GenBank
<i>Tick-borne encephalitis virus</i>	Far Eastern subtype	<i>Soffjin</i>	X07755
		<i>Soffjin-Chumakov</i>	KC806252
	Siberian subtype	<i>Vasilchenko</i>	L40361
		<i>Zausaev</i>	AF527415
	Baikal subtype	886-84	EF469662
	Himalayan subtype	<i>Himalaya-1</i>	MG599476
<i>Himalaya-2</i>		MG599477	
-	-	178-79	EF469661
<i>Представители других флавивирусов, переносимых клещами</i>			
<i>Spanish sheep encephalitis virus</i>			DQ235152
<i>Louping ill virus</i>			NC001809

<i>Greek goat encephalitis virus</i>	DQ235153
<i>Turkish sheep encephalitis virus</i>	DQ235151

2.1.3. Клеточные культуры

Культуру клеток СПЭВ пересеивали из расчета 1,0-1,5 млн. клеток в 1 мл. Для культивирования клеток СПЭВ использовали среду Игла DMEM («Биолот», Санкт-Петербург) с глутамином (рН – 7,4) с 8% инактивированной сыворотки КРС («Биолот»), с добавлением гентамицина до 0,1%. Для поддержания культуры СПЭВ использовали среду того же состава с 2% сыворотки КРС. Снятие клеток со стекла проводили с помощью 0,02% раствора Версена («Биолот»).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Вирусологические методы

Культивирование штаммов ВКЭ. Для накопления вируса готовили суспензию лиофилизированных штаммов в разведении 10^{-3} с применением среды Игла MEM, с добавлением 2% сыворотки КРС и антибиотиков (200 Ед/мл). Полученной суспензией заражали сосунков нелинейных белых мышей (по 0,03 мл интрацеребрально) или перевиваемую культуру клеток СПЭВ. Сбор «культурального» вируса проводили до полного лизиса клеток. Полученную вирусосодержащую культуральную жидкость центрифугировали для удаления клеточного детрита (30 мин. при 3000 об/мин). Вскрытие зараженных ВКЭ животных проводили на 5-7 сутки с момента заражения на пике клинической картины заболевания. Содержание, кормление, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986), а также в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755).

Титрование штаммов ВКЭ по цитопатическому действию (ЦПД) проводили в культуре клеток СПЭВ в 96-луночных планшетах. Титры

вируса определяли по методу Рида и Менча (Reed L., 1938) и выражали в \lg ТЦД₅₀/мл.

Титрование штаммов ВКЭ по бляшкообразованию проводили в культуре клеток СПЭВ, выращенной в пластиковых 24 луночных планшетах («SARSTED», Германия) под агаровым покрытием, состоящим из двух равных частей трижды дистиллированной воды с 2,5% агара Difco (BD, USA) и жидкой питательной среды следующего состава: 10х раствор Эрла – 20%, трижды дистиллированная вода – 44%, раствор бикарбоната натрия – 7%, сыворотка КРС – 1,5%, протамин сульфат в концентрации 600γ/мл и нейтральный красный в разведении 1:1000 – 4%.

S-признак. Учет размера бляшек проводили на 5-е сутки после заражения. S-признак учитывали как S⁺ при диаметре бляшки (d) $\geq 2,5$ мм; S[±] - при $2,5 > d \geq 2,0$; S⁻ - при $2,0 > d \geq 1,0$ (Верхозина М.М., 2017).

Терморезистентность (Т₅₀) штаммов ВКЭ определяли с использованием суточной культуры клеток СПЭВ, выращенной в 96-луночных планшетах в атмосфере CO₂ (Овчинникова Э.А., 1967). Уровень терморезистентности оценивали по индексу инактивации – разнице \lg титров прогретого в течение 15 мин при температуре 50°C и непрогретого (4°C) вируса.

Rct₄₂ признак. Для определения способности штаммов ВКЭ к репродукции при супраоптимальной температуре суточную культуру клеток СПЭВ, выращенную в 96-луночных планшетах, заражали 10х разведениями вирусодержащей суспензии (с 10⁻¹ до 10⁻¹⁰) (Козлова И.В., 2016). При этом часть клеточных культур, зараженных одним и тем же штаммом, инкубировали при температуре 37°C и 42°C в атмосфере CO₂. Признак rct₄₂ определяли на 6-й день после заражения культуры СПЭВ и оценивали по разнице \lg титров вируса при культивировании штаммов в двух температурных режимах. Признак оценивали как rct₄₂₊, если разница титров была $\leq 2,0 \lg$, как rct₄₂₋ при разнице титров $\geq 3,1 \lg$, результат оценивали как промежуточный, если этот показатель варьировал от 2,1 до 3,0 \lg .

Нейроинвазивность. Для определения нейроинвазивности штаммов заражали беспородных белых мышей массой 6-8 г. в мозг по 0,03 мл и под кожу по 0,25 мл инокулята. Животных, зараженных интрацеребрально, наблюдали в течение 14 дней, зараженных экстраневрально – 21 день. Титры вируса определяли по методу Рида и Менча (Reed L., 1938). Для оценки степени нейроинвазивности вычисляли *индекс инвазивности (И)* – разницу титров вируса при внутримозговом (mNic) и подкожном (mNsc) заражении, выраженную в IgLD50/мл (Pogodina V.V., 1964). При значении *И* в пределах 1-2,5 делали заключение о высоких инвазивных свойствах штамма, способности преодолевать ГЭБ, достигать ЦНС и размножаться в ней. При значении $И \geq 3$ делали вывод о сниженной инвазивной активности штамма.

2.2.2. Молекулярно-генетические методы

Экстракция РНК. Готовили 10% суспензии, полученные из тканей головного мозга инфицированных ВКЭ мышей, которые далее центрифугировали в течение 15 мин при 300 об./мин. Экстракцию РНК/ДНК осуществляли с помощью набора «РИБО-преп» («AmpliSens», Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Аmplификация ДНК. ОТ-ПЦР проводили с помощью набора Reverta L-100, содержащего рандомизированные экзануклеотиды («AmpliSens», Москва). ПЦР-реакцию проводили в 20 мкл реакционной смеси согласно инструкциям производителя («BioSan», Новосибирск) с 3 мкл кДНК и парой соответствующих праймеров (амплификатор «Bio-Rad Laboratories»). Праймеры для исследования были любезно предоставлены С.Е. Ткачевым.

Таблица 2.3 - Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации и секвенирования кДНК вируса клещевого энцефалита

Праймер	Позиция в геноме ВКЭ (относительно штамма Neudoerfl (U27495))	Последовательность праймера (5' – 3')
E23	1-18	AGATTTTCTTGCACGTGC
E25R	625-646	CCTGGTCTATGGTCACACACTC
E27	511-530	ACTGTGATCAGGGCTGAAGG
E27R	943-962	GGAGCCAGGCAGAGGAGCAC
E29	902-919	TGACCGTGGAAAGTGTGG

E24	1210-1227	CTCTTCAGCCAAAGTGGC
E3	1090-1109	TCAATGGATGTGTGGCTTGA
E5R	1510-1531	TGCACAACAAGGACACATCTCC
Ef1	1449-1469	GAGGAAGACGGCATCCTTCAC
Er1	1783-1804	CATCAATGTGCGCCACAGGAAC
E31	1693-1712	CTGGTTGAATTTGGAGCTCC
E31R	2032-2051	GGTGTATCAGCATGGCCAC
E33	1992-2011	CCCAGTGCGGGCAGTGGCAC
E4	2368-2387	CTCATGTTTCAGGCCCAACCA
E7	2197-2217	GGCATAGAAAGGCTGACAGTG
E10	2515-2537	GATACCTCTCTCCACACAACCAG
E35	2368-2387	TGGTTGGGCCTGAACATGAG
E35R	2973-2992	CGTGTGTTGGTTCCTGTCTG
E12F	2935-2954	TTTGGAGTTGGCCTGAGAAC
E12	3365-3384	CACCTTGCCACTCTCTGTGG
E13	3249-3270	ACAGGTGAAAGGACCATGGAAG
E13RS	3819-3839	GTCACCATCTCTCGGACAGTG
E14F	3765-3784	TGTGTTTGAGCTGAGGGTGG
E14	4363-4382	TCCACACAGCCACTCCATTC
E15-W	4201-4222	AGACGATCTTTCAGTGAACCAC
E15R	4874-4893	CTGCACTGTCTCACTTTCC
E16F	4740-4759	TGTCCTGCACACGATGTGGC
E16	5408-5427	CAGGCGTCTGTTGACATAGG
E17	5210-5229	GGAAGACCCACAGAGTCCTC
E17R	5783-5804	CTGGAGTAGTCCTTCTCAAAGG
E18FS	5653-5672	GATGGGTTTGACTGGATCAC
E18RS	6205-6224	CAATGAGTGAGAAGGTGTCG
E19	6143-6163	AGGACAAGATGCCAGAGGTGG
E19RS	6715-6734	AGGGAGGCCAGCAGTACCAG
E20FS	6663-6682	CATCTGGTGCTTCGTTGTCC
E20	7272-7291	GTCCAGACACCACAATGGCC
E21F	7059-7081	GTTACACCATAACATCATCCACC
E21RS	7624-7643	AGCCAGAGTCGGTGCCCAAG
E22F-W	7537-7559	AGGCCGGAGGCTGACACACTGTG
E22R-W	8120-8142	CTCACCTCCACAGCGGCATCTG
E23F	7995-8018	TGAAACTCCAAGATGGTGACAAG
E23R	8650-8669	GCGTTCATGGCCAGCTGAG
NS5-1F	8571-8591	GACATGGCAGTATTGGGGCAG
NS5-1R	9092-9111	GCTCCCCAGCCACATGTACC
NS5-2F	8964-8986	GCAGCTCGTGGATGAAGAGAGAG
NS5-2RS	9634-9653	CCACTGACGAGCATTCTTCC
NS5-3F	9501-9520	CACCCTCACCAACATAAAGG
NS5-3R	10125-10142	TGCATGAAGGGGTTGTCC
NS5-4F	10069-10087	GGAGCCTGGATGACCACAG
NS5-4R	10387-10406	TCCAGGTTTTGCTCAGTCAC
3UTR-1F	10246-10265	GCCAAGAACATTTGGGGAGC
3UTR-1R	10968-10986	CTTCCCTCCTCCCGGAAGC
3UTR-2F	10844-10862	CAGTGAGAGTGGCGACGGG
3UTR-2R	11122-11141	AGCGGGTGTTTTTCCGAGTC

Секвенирование ДНК. Для полногеномного секвенирования использовали наборы ПЦР-фрагментов разной длины (298-693 п.н.) (Табл. 2.3), соответствующих определенным фрагментам генома ВКЭ и перекрывающихся друг с другом на 50-100 п.н. Нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР, очищенных с помощью колонок GFX («Amersham Biosciences», USA), определяли с использованием генетического анализатора ABI PRISM 3100 («Applied Biosystems», USA). Сборку последовательностей полученных ПЦР-фрагментов в полногеномные проводили с помощью программы MEGA 6.0 (Tamura K., 2013). Определенные в ходе выполнения работы последовательности генома ВКЭ были зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами доступа KY069119-KY069126.

2.2.3. Филогенетические методы

2.2.3.1. Анализ последовательностей ВКЭ

Выравнивание нуклеотидных последовательностей произведено с помощью программы MUSCLE. Филогенетический анализ выполнен методом Bayesian Markov chain Monte-Carlo в пакете программ BEASTv. 1.10.4. Достоверность построенных деревьев оценивали с помощью показателя апостериорной вероятности.

Подготовка входных xml файлов для байесовского анализа была проведена в программе BEAUTI, входящей в пакет BEAST. С целью определения времени дивергенции штаммов для каждого из них была указана дата изоляции согласно базам данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) и ViPR (<http://www.viprbrc.org/>). В качестве модели накопления нуклеотидных замен была использована модель GTR (GeneralTime-reversible). В качестве модели гетерогенности сайтов была использована модель Gamma+Invariant Sites(число гамма категорий 4). Была применена модель ослабленных (некоррелированных логнормальных) молекулярных часов. Анализ МСМС проводился 100 миллионов поколений с отбором каждого тысячного поколения и 10% отжигом. Сходимость

параметров оценивалась на основе достижения ESS значений >200 с использованием программного обеспечения Tracer версии 1.5. Дерево с максимальной достоверностью клад (MCC) было сгенерировано с помощью Tree Annotator и визуализировано в FigTreev. 1.4.4.

Дизайн выполненного исследования представлен на рисунке 2.

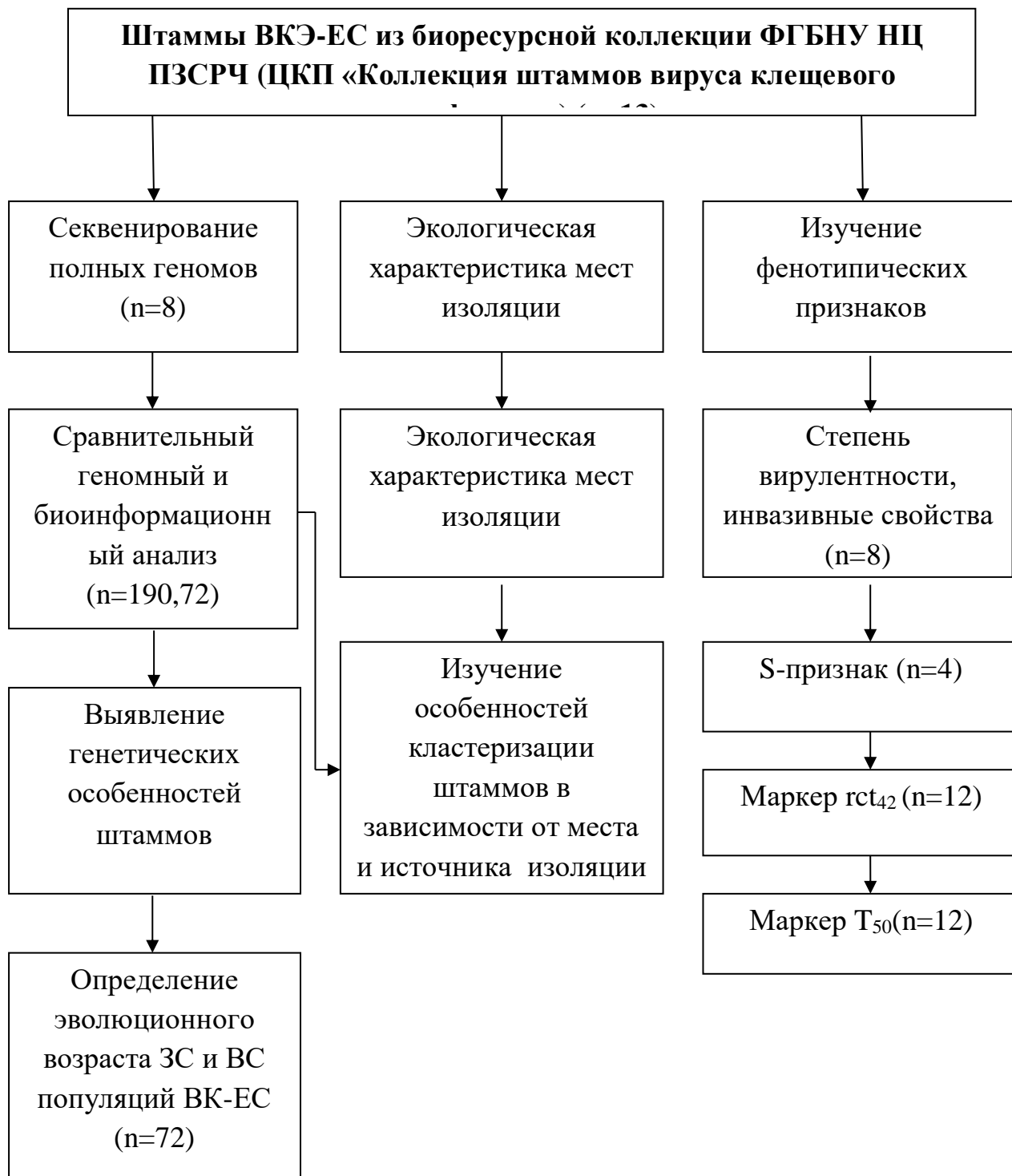


Рисунок 2. - Дизайн исследования

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ГЕНОМОВ ШТАММОВ ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ИЗ ЭЛЕКТРОННЫХ БАЗ ДАННЫХ GENBANK и ViPR

Одним из главных направлений в области изучения ВКЭ продолжает оставаться анализ структуры генома. На момент начала наших исследований в международной электронной базе данных GenBank насчитывалось 3096 нуклеотидных последовательностей ВКЭ, из них большая часть (1074) была представлена последовательностями гена белка Е. Именно этот ген, как правило, использовался в качестве основного маркера для проведения филогенетических и филогеографических исследований, однако наибольшей информативностью для этих целей обладают полногеномные последовательности вируса.

На первом этапе наших исследований был проведен сравнительный анализ полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС и других субтипов вируса, а также некоторых представителей флавивирусов, переносимых клещами, депонированных в электронную базу данных GenBank. Для этих целей на основе данных о 190 полногеномных последовательностях ВКЭ (10245 п.н.) с помощью метода Bayesian Markov chain Monte-Carlo было построено филогенетическое древо (Рис. 3.1).

На данном древе нуклеотидные последовательности штаммов ВКЭ образовали два кластера. В первый из них вошли последовательности ВКЭ-ЕС, а также последовательности вирусов: Шотландского энцефаломиелита овец (ШЭО, LI), Испанского энцефалита овец (SSEV), Турецкого энцефалита овец (TSEV) и Греческого энцефалита коз (GGEV). Причем последовательности вирусов LI и Испанского энцефалита овец, а также Турецкого энцефалита овец и Греческого энцефалита коз образовали две отдельные клады внутри данного кластера.

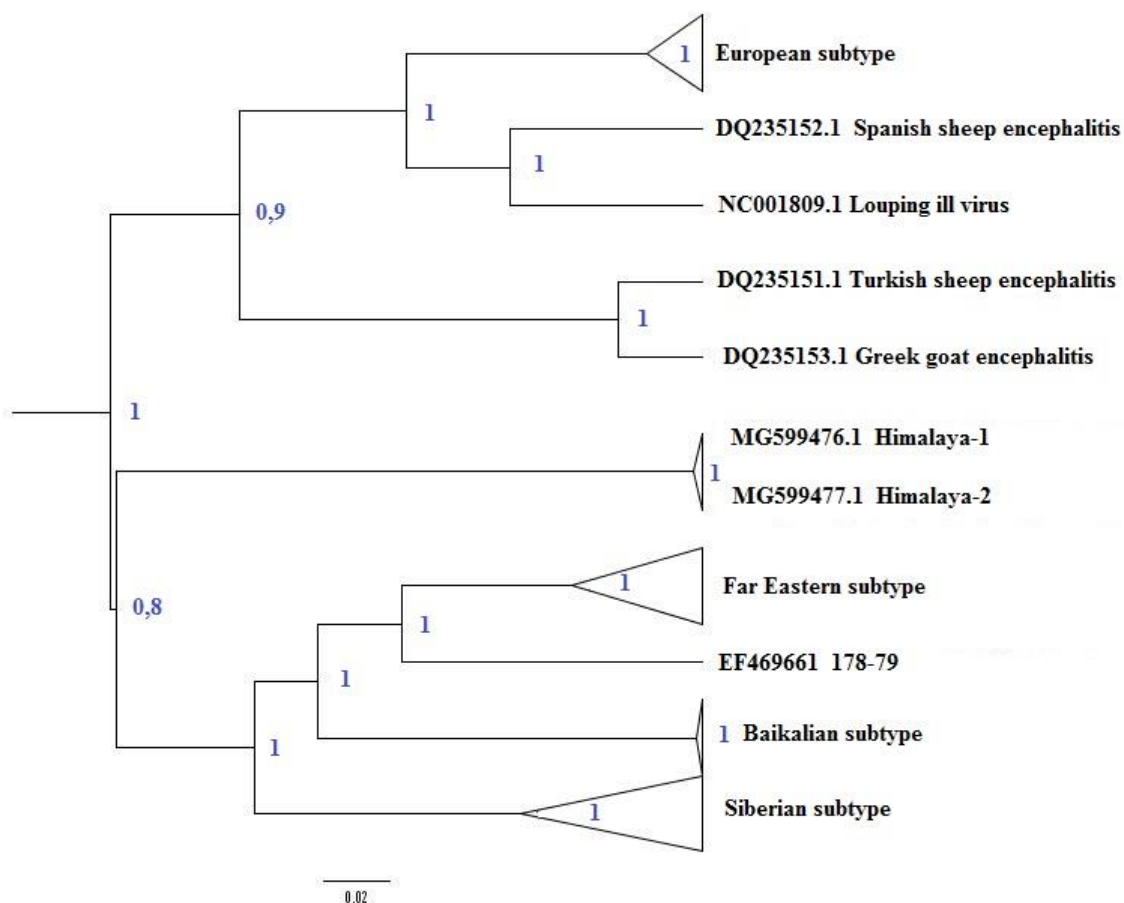


Рисунок 3.1 - Филогенетическое древо, построенное на основе 190 полногеномных последовательностей ВКЭ (10245 п.н.) и представителей флавивирусов, переносимых клещами, с помощью метода Bayesian Markov chain Monte-Carlo в пакете программ BEAST v. 1.10.4.

Во второй кластер вошли последовательности ВКЭ дальневосточного, сибирского, байкальского, гималайского субтипов и штамма 178-79.

Уровень различий нуклеотидных последовательностей кодирующей области генома штаммов TBEV-Eur составил: с GGEV - 14,2-14,4%, с TSEV - 14,5-14,9%, с SSEV - 12,6-13,0%, вирусом LI – 11,9-13,0% (Табл. 3.1) (Савинова Ю.С., 2021).

Таблица 3.1 - Уровни различий нуклеотидных последовательностей кодирующей области генома между штаммами вируса клещевого энцефалита европейского субтипа и другими флавивирусами, переносимыми клещами (%)

тип вируса\ субтип	Louping ill TBEV			
	TSEV (Турецкий энцефалит овец)	GGEV (Греческий энцефалит коз)	LI (Шотландский энцефаломиелит овец)	SSEV (Испанский энцефалит овец)
ТBEV-Eur (ВКЭ-ЕС)	14,5-14,9	14,2-14,4	11,9-13,0	12,6-13,0

При этом уровень различий нуклеотидных последовательностей кодирующей части генома у штаммов ВКЭ-ЕС и других известных субтипов ВКЭ составил: с ВКЭ-ДВ – 16-17%, с ВКЭ-Сиб – 14-16%, с ВКЭ-БК – 15-16%, со штаммом 178-79 и ВКЭ-Гим – 16% (Табл.3.2).

Таблица 3.2 - Уровни различий нуклеотидных последовательностей кодирующей части генома у различных субтипов ВКЭ (%)

Субтип	ВКЭ-ЕС	ВКЭ-ДВ	ВКЭ-Сиб	ВКЭ-БК	178-79	ВКЭ-Гим
ВКЭ-ЕС	*	16-17	14-16	15-16	16	16
ВКЭ-ДВ	16-17	*	14-15	12-13	11	16
ВКЭ-Сиб	14-16	14-15	*	13-14	14-15	15
ВКЭ-БК	13-14	12-13	13-14	*	12	15
178-79	16	11	14-15	12	*	15-16
ВКЭ-Гим	16	16	15	15	15-16	*

Таким образом, нами показано, что уровень различий между нуклеотидными последовательностями кодирующей части генома у ВКЭ-ЕС и другими субтипами вируса сопоставим или даже превышает уровень различий между штаммами ВКЭ-ЕС и вирусами подгрупп Турецкого и Шотландского энцефалита.

В целом полученные нами данные не противоречат таксономическому предложению, выдвинутому ранее Grard G. и соавт. (Grard G., 2007).

Среди исследованных групп штаммов, относящихся к трем основным субтипам, различия по кодирующей области генома и соответствующей ей

последовательности полипротеина минимальными были у штаммов ВКЭ-ЕС (3,1 и 1,5% соответственно), что свидетельствует о более высокой степени его генетической однородности в сравнении с дальневосточным и сибирским субтипами (Табл. 3.3).

Таблица 3.3 - Максимальные значения различий между штаммами вируса клещевого энцефалита по кодирующей области генома и по соответствующим последовательностям полипротеина

Субтип ВКЭ	Количество проанализированных последовательностей	Различия по кодирующей области генома	Различия по последовательности полипротеина
ВКЭ-ДВ	75	6,6	2,9
ВКЭ-ЕС	67	3,1	1,5
ВКЭ-Сиб	24	7,8	4,2

При этом нами отмечено, что максимальные показатели различий выявлены не между штаммами ВКЭ-ЕС из крайних точек ареала, как можно было бы предположить, а между штаммами из Центральной и Северной Европы: *Huyp* (U39292) (1953 год изоляции) из Чешской Республики и *Mandal-2009* (KF991107) (2009 г.) из Норвегии (3,1%), а также между прототипным штаммом *Neudoerfl* (U27495) из Австрии (1971 г.) и *JP-554* (KX966399) из Швеции (2008 г.) (3,06%). В то время как различия между нуклеотидными последовательностями изолятов ВКЭ-ЕС из Западной или Северной Европы с последовательностями изолятов из крайней восточной точки ареала (Южная Корея) составили: 2,69 и 2,72% между штаммами *NL/UH-2016* и *KrM-93* и *KrM-213* соответственно, 2,18 и 2,21% между штаммом *Mandal-2009* и изолятами *KrM-93* и *KrM-213* - соответственно (Савинова Ю.С., 2021).

Минимальный уровень различий (<1%), как правило, наблюдался у штаммов ВКЭ-ЕС, выделенных в одном регионе

Уже в процессе подготовки рукописи диссертационной работы появились новые данные, свидетельствующие о расширении границ изменчивости внутри ВКЭ-ЕС. Так, например, в Нидерландах был изолирован штамм ВКЭ-ЕС *NL*. По данным А.А. Девяткина, нуклеотидные последовательности штамма *NL* из

Нидерландов отличаются от всех других нуклеотидных последовательностей ВКЭ-ЕС как минимум на 8% (Deviatkin A.A., 2020; Dekker M., 2019). В результате филогенетического анализа, проведенного нами с помощью программы MEGA 7.0 (Табл.3.4), показано, что уровень различий по кодирующей области генома штамма *NL* прототипным штаммом *Neudoerfl* составил 8,9%, а гомология со штаммами из Сибири варьировала в пределах 91,3-91,4%.

Таблица 3.4 - Уровень различий по кодирующей области генома между штаммами ВКЭ-ЕС из Сибири, прототипным штаммом *Neudoerfl* и штаммом *NL* (LC171402) из Нидерландов

Название штамма	№ доступа в GenBank	1	2	3	4	5	6
1. 84.2	HM120875	*					
2. <i>Irkutsk BR99-08</i>	KP331441	0.1%	*				
3. <i>IG-98</i>	KY069119	0.1%	0.2%	*			
4. 262-74	KY069122	0.1%	0.2%	0.2%	*		
5. <i>Zmeinogorsk-1</i>	KY069124	1.6%	1.7%	1.7%	1.6%	*	
6. <i>NL</i>	LC171402	8.6%	8.7%	8.7%	8.7%	8.6%	*
7. <i>Neudoerfl</i>	U27495	2.6%	2.7%	2.6%	2.6%	2.4%	8.9%

В 2019 г. из пула клещей *I. ricinus*, собранных на юге Англии, был выделен штамм *UK-Hampshire2019* (MN661145). Гомология этого штамма со всеми другими представителями ВКЭ-ЕС также выходит за ранее установленные границы генетической изменчивости субтипа (Holding M., 2020).

Наличие таких дивергентных штаммов, расширяющих установленные ранее границы варибельности внутри ВКЭ-ЕС (приблизительно от 3% до 9%) заставило нас включить их в уже имеющуюся выборку для проведения филогенетического анализа.

Нами осуществлен анализ полных нуклеотидных последовательностей геномов ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Евразии. Из взятой в анализ выборки были исключены клоны, гибриды, штаммы в полипротеине которых

выявлено наличие крупных делеций и др. В итоге были отобраны последовательности полипротеина 72-х штаммов и изолятов ВКЭ-ЕС, выделенных на территории 13 европейских стран: Финляндии, Словении, Словакии, Эстонии, Германии, Австрии, Финляндии, Норвегии, Венгрии, Чехии, Нидерландов, Дании, Швеции, Великобритании в период с 1953 по 2019 гг., а также все полногеномные последовательности штаммов данного субтипа из России и Южной Кореи.

Для визуализации данных на основании оставшихся в выборке нуклеотидных последовательностей ($n=72$) было построено филогенетическое дерево (Рис. 3.2). Для этих целей нами был применен байесовский статистический подход (метод Монте-Карло по схеме марковских цепей, MCMC), реализуемый в пакете программ BEAST v1.10.4. Применялась модель накопления нуклеотидных замен GTR + I + G и модель ослабленных (некоррелированных логнормальных) молекулярных часов. Анализ MCMC проводился путем генерации 100 миллионов поколений с отбором каждого тысячного поколения и 10% отжигом. Сходимость параметров оценивалась на основе достижения ESS значений >200 с использованием программного обеспечения Tracer версии 1.5. Дерево с максимальной достоверностью клад (MCC) было сгенерировано с помощью Tree Annotator и визуализировано в FigTree. Апостериорная вероятность для каждого узла филогенетического дерева отмечена на рисунке 3.2 в долях.

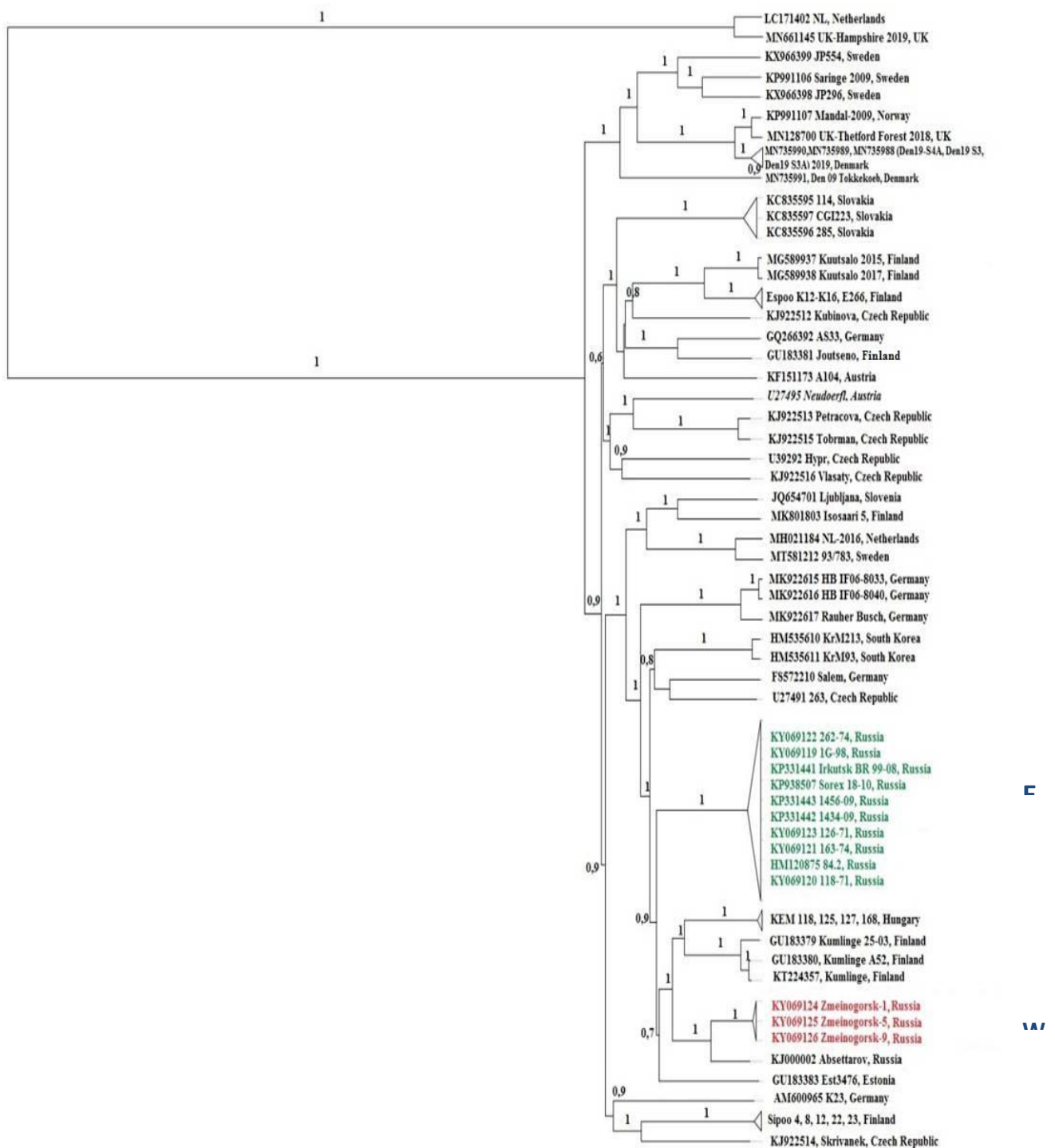


Рисунок 3.2 - Филогенетическое дерево, построенное на основе 60 полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ европейского субтипа с применением байесовского метода МСМС.

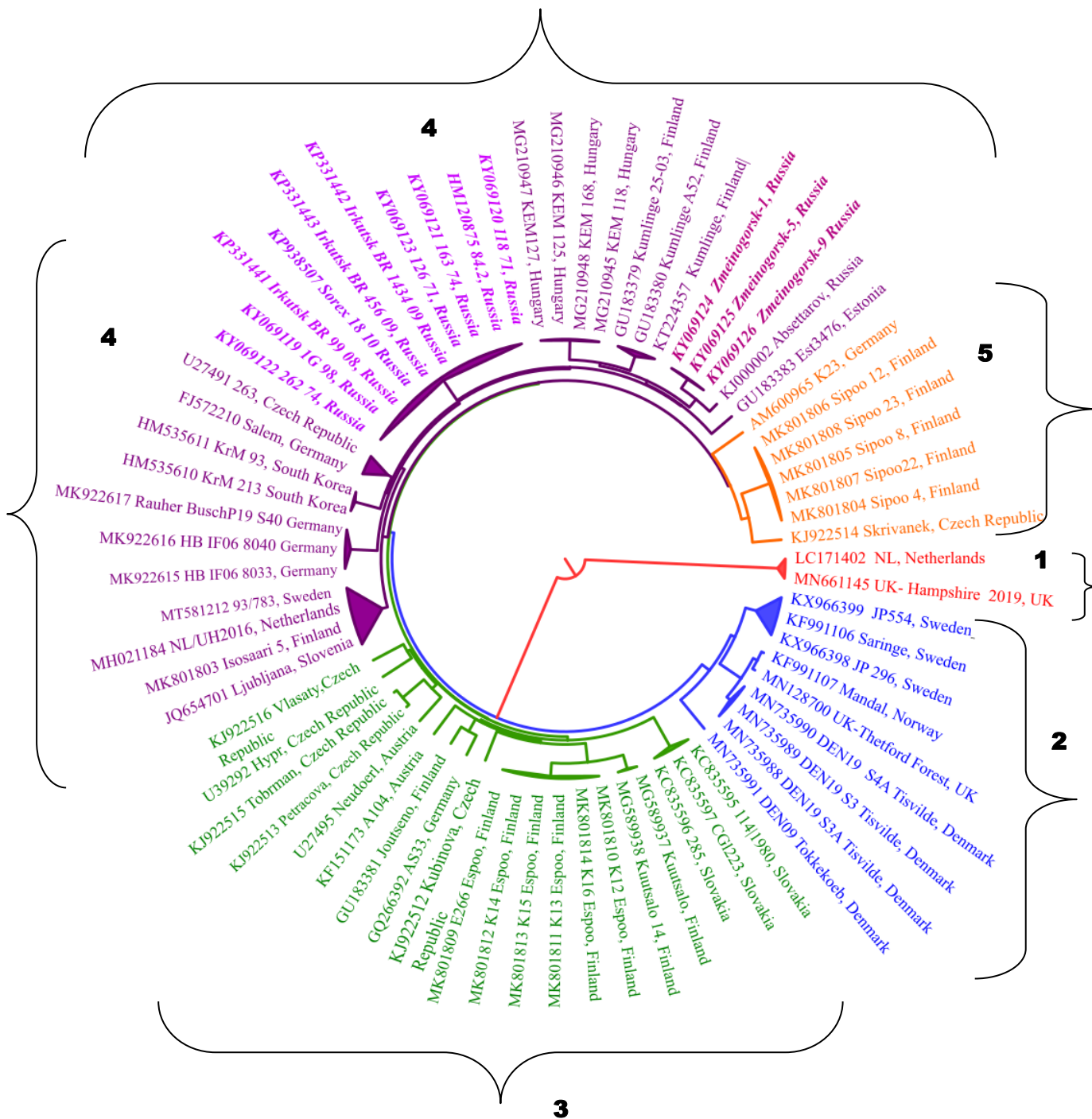


Рисунок 3.3 - Филогенетическое дерево, построенное на основе 60 полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ европейского субтипа с применением байесовского метода МСМС.

На основании проведенного анализа, на филогенетическом древе нами условно выделено 5 кластеров (рисунки 3.2 и 3.3).

В **первый кластер** вошли нуклеотидные последовательности штаммов из Нидерландов и Великобритании. Штамм *NL* (LC171402) был выделен в 2016 г. из пула клещей *I. ricinus*, собранных в национальном парке Салландсе

Хёвелруг (Sallandse Heuvelrug) в Нидерландах (Jahfari S., 2017). Как мы уже отмечали, гомология этого штамма с другими известными в настоящее время последовательностями штаммов ВКЭ-ЕС составляет около 91%.

Наиболее близкой к данной нуклеотидной последовательности была последовательность штамма *UK-Hampshire2019* (MN661145) (Хэмпшир, 285 метров н.у.м.). По сравнению со штаммом *TBEV-NL*, штамм из *Hampshire* содержит 49 однонуклеотидных полиморфизмов, приводящих к 12 аминокислотным заменам в кодирующей области генома (Holding M., 2019).

Во **второй кластер** вошли штаммы из Норвегии, Великобритании, Дании и Швеции. Штамм *Mandal-2009* (KF991107) и изолят *UK-Thetford Forest 2018* (MN128700) из Великобритании образовали общую ветвь (статистическая поддержка 100%). Штамм *Mandal-2009* был выделен из пула, состоящего из десяти нимф *I. ricinus*, собранных в *Mandal* (Норвегия) в 2009 г. (Asghar N., 2014) *Mandal* расположен в устье реки Мандалсельва в южной части долины Мандален (82 м н.у.м.). Изолят из Великобритании был детектирован в клеще *I. ricinus*, собранном в 2018 г. в Тетфордском лесном парке, расположенном между графствами Norfolk/Suffolk на востоке Англии (Holding M., 2020). Необходимо отметить, что это было первое обнаружение ВКЭ на территории Великобритании - островного государства, ранее считавшегося эндемичным в отношении КЭ.

Штаммы из Дании и Швеции кластеризовались в соответствии с территорией их изоляции и располагались на отдельных ветвях. Штаммы *DEN19_S4A_Tisvilde* (MN735990), *DEN19_S3A_Tisvilde* (MN735988) и *DEN19_S3_Tisvilde* (MN735989) были выделены в 2019 г. от клещей *I. ricinus*, собранных в лесном массиве на территории Tisvilde Hegn, расположенном на северном побережье острова Зеландия (Дания) (15 м н.у.м.) (Agergaard C.N., 2019). Штамм *Saringe-2009* (KF991106) был изолирован в 2009 г. от нимфы *I. ricinus*, присосавшейся к человеку в окрестностях Саринге (Швеция) (26 м н.у.м.) (Asghar N., 2014). Штаммы *JP-296* (KX966398) и *JP-554* (KX966399) были выделены из клещей *I. ricinus*, собранных в 2016 г. в природном очаге в

Торё на юге Стокгольма (26 м н.у.м.) (Asghar N., 2017). N. Asghar и соавт. было показано, что два этих штамма группируются в единую скандинавскую филогенетическую группу со штаммами *Toro-2003*, *Saringe_2009* из Швеции и *Mandal-2009* из Норвегии, отдельную от других клад, сформированных штаммами ВКЭ-ЕС из Европы (Asghar N., 2017).

Отдельную ветвь во втором кластере образовал штамм *DEN-09-Tokkekoeb* (MN735991) из Дании. Этот штамм был изолирован от клещей *I. ricinus*, собранных в лесу Tokkekøb Hegn на территории Северной Зеландии (высота над уровнем моря 50 м) (Agergaard C.N., 2019).

В **третий кластер** вошли нуклеотидные последовательности штаммов из Словакии, Финляндии, Чехии, Германии, Австрии. Внутри этого кластера выделено несколько отдельных клад. Первую из них сформировали штаммы, изолированные в период 1980-1990 гг. на территории Словакии. Они являются частью исторической коллекции вирусов Департамента вирусологической экологии Словацкой академии наук. Штамм *CGI223* был выделен в 1990 г. в Загорской Весе из мозга рыжей полевки *Myodes glareolus*. Штаммы *114* и *285* были изолированы от клещей *I. ricinus*. Внутри третьего кластера отдельную кладу с апостериорной вероятностью 100% образовали штаммы *Kuutsalo-2015* (MG589937) и *Kuutsalo-2017* (MG589938) (Kuivanen S., 2018). Штамм *Kuutsalo-2015* был выделен из мозжечка больного КЭ человека, штамм *Kuutsalo 2017* - от клещей *I. ricinus*. Все эти штаммы были изолированы из материала, собранного в юго-восточной Финляндии на территории острова Кутсало, расположенного в Финском заливе Балтийского моря (263 метров н.у.м.).

Следующую кладу сформировали нуклеотидные последовательности штаммов *E256 Espoo2017* (MK801809), *K12 Espoo2018* (MK801810), *K13Espoo2018* (MK801811), *K14Espoo2018* (MK801812), *K15 Espoo2018* (MK801813) и *K16 Espoo2018* (MK801814). Эти штаммы были выделены от клещей *I. ricinus*, собранных недалеко от г. Эспоо, расположенного на берегу Финского залива Балтийского моря, западнее города Хельсинки, в районе Уусимаа Финляндии (высота 80 метров н.у.м.) (Smura T., 2019). С

апростериорной вероятностью 84% к кладе, сформированной этими штаммами, примыкает ветвь, образованная нуклеотидными последовательностями штамма *Kubinova* (KJ922512) из Чешской Республики. Этот штамм был изолирован в 1953 г. из крови больной, перенесшей тяжелую форму КЭ во время вспышки КЭ в Центральной Богемии (Formanova P., 2015). Эта ветвь вплотную примыкает к кладе, которую образуют штамм *As33* (GQ266392) из Германии и штамм *Joutseno* (GU183381) из Финляндии (апостериорная вероятность - 100%). Штамм *As33* изолирован в 2005 г. от клещей *I. ricinus* в Баварии (Амберг, Германия, 374 н.у.м.) (Курса А.М., 2010). Штамм *Joutseno* выделен из мозга мыши в 1960 г. в одноименном районе Южной Финляндии, который расположен недалеко от озера Сайма в 9 км от границы с Россией (высота 80 метров н.у.м.) (Uzategui N.Y., 2012). К этой кладе примыкает ветвь, образованная штаммом *A104* (KF151173), изолированным от *Apodemus flavicollis* в 1990 г. (Frey S., 2013).

Следующая клада образована штаммами из Австрии и Чехии. Штаммы из Чехии были выделены в 1953 г. из крови пациентов, заболевших КЭ во время вспышки в 1953 г. в Центральной Богемии (Чехословакия). У всех пациентов было тяжелое течение КЭ. Это старейшие изоляты ВКЭ в Европе. Они не образуют монофилетическую группу, несмотря на то, что были изолированы в течение одного сезона и в одном и том же регионе. Штаммы *Tobrman* и *Petracova* образовали кладу, родственную штамму *Neudoerfl* (U27495), выделенному в Австрии в 1971 году от *I. ricinus*, недалеко от одноименной деревни в Бургенланде (Австрия)(Mandl C.W., 1988).

Штамм *Hupr* был изолирован в 1953 г. из крови заболевшего мальчика в Чехословакии (Wallner G., 1996). Этот штамм обладает более вирулентным фенотипом на мышинной модели, чем штамм ВКЭ *Neudoerfl*. Наиболее тесное генетическое родство к нему демонстрирует штамм *Vlasaty* (KJ922516) из Чехии.

В самый обширный **четвертый кластер** вошли 30 штаммов из Венгрии, Германии, Нидерландов, России, Словении, Финляндии, Чехии, Швеции, Эстонии и Южной Кореи.

Штаммы *Ljubljana-1* (JQ654701) из Словении и *Isosaari-5* (MK801803) из Финляндии образовали единую кладу (апостериорная вероятность 100%). Штамм *Ljubljana-1* был изолирован из сыворотки крови больного КЭ человека в 1992 г. (Fajsl., 2012). Город *Ljubljana* расположен в межгорной Люблянкой котловине на берегах реки Любляницы (высота центра 295 м н.у.м.). Штамм *Isosaari-5* был изолирован от клещей *I. ricinus* на территории одноименного восточного острова в регионе Хельсинки (184 м н.у.м.) (Smura T., 2019). Штамм *NL/UN* (MH021184) из Нидерландов, выделенный в 2016 г. от клещей *I. ricinus* (de Graaf J.A., 2016) вместе с двумя вышеописанными штаммами входит в общую кладу, формируя в ней субкладу со штаммом *93/783* из Швеции. Штамм *93/783* был выделен в 2019 г. из крови больного КЭ человека из Швеции, у которого позже развился энцефалит. Данный штамм прошел минимальное количество пассажей. Штамм *93/783* обладает более высокой вирулентностью по сравнению с другими штаммами европейского, сибирского и дальневосточного субтипов (Lindqvist R., 2020).

Отдельную кладу внутри второго кластера также сформировали штаммы *NB IF06 8033* (MK922615), *NB IF06 8040* (MK922616) и *Rauher BuschP19 S40* (MK922617) из Германии. Они были изолированы в 2018 г. из пулов *Ixodes* spp., собранных на флаг на территории Нижней Саксонии в лесу «Rauher Busch» (84 м н.у.м) и на участке Varsinghausen /Mooshuette (142 м н.у.м.) (Boelke M., 2019).

Отдельную ветвь сформировали штаммы из Южной Кореи – *KrM 213* (NM535610) и *KrM 93* (NM535611). Эти два штамма были выделены из тканей легких *Apodemus agrarius*, отловленных в двух разных провинциях: Гурье-гун в Чонлланам-до (юго-западная часть Кореи, высота н.у.м. – 532 м) и Хапчон-гун в Кёнсан-Намдо, расположенной в южной части Корейского полуострова в горной местности (Yun M.C., 2011). Наиболее близкородственными к южнокорейским штаммам являются штаммы *Salem* (FJ572210) и *263* (U27491).

Первый из них был выделен в 2006 г. в Германии из мозга *Macaca sylvanus*, заразившейся ВКЭ естественным путем при содержании в открытом вольере (Süss J., 2007). Штамм 263 был изолирован в 1987 г. от клещей *I. ricinus*, собранных на территории Южной Богемии (Чешская Республика), граничащей с Германией (Wallner G., 1995).

Штаммы из Восточной и Западной Сибири образовали две отдельные клады в соответствии с местом их изоляции, которые были условно обозначены нами как западно-сибирский и восточно-сибирский варианты (WS и ES). Более подробное описание генетических особенностей этих двух линий и сравнительный анализ с другими штаммами ВКЭ-ЕС даны в главе 4.

К кладе, образованной штаммами из Западной Сибири, тесно примыкает штамм *Absettarov* (KJ000002), выделенный в 1951 г. в Ленинграде (г. Санкт-Петербург) из крови 3-летнего мальчика с двухфазной лихорадкой и признаками менингита. Место изоляции этого штамма географически находится достаточно далеко от Западной Сибири. Также к этой кладе примыкает штамм *Est3476* (GU183383), который был выделен в 2000 г. от больного человека в Эстонии (Uzcategui N.Y., 2012).

К штаммам, сформировавшим восточно-сибирскую линию, тесно примыкает штамм 84.2 (HM120875) из Западной Сибири. Этот штамм был изолирован в 2007 г. от клещей *I. persulcatus*, отловленных на территории Майминского района Республики Алтай (Якименко В.В., 2019). Данный район расположен в северо-западной части Республики Алтай, на севере Горного Алтая в отрогах хребта Иолго.

Самостоятельную кладу с двумя субкладами образовали штаммы из Венгрии и Финляндии. В первую из них вошли штаммы *KEM-118* (MG210945), *KEM-125* (MG210946), *KEM-127* (MG210947) и *KEM-168* (MG210948) из Венгрии. Источником изоляции для этих штаммов послужили личинки и нимфы клещей *Ixodes* spp. (Egyed L., 2018). Штаммы *KEM-118* и *KEM-168* были выделены от личинок *I. ricinus* в 2011 и 2016 гг. Штамм *KEM-125* изолирован от нимф *I. ricinus*, а штамм *KEM-127* выделен от нимф клещей

Haemaphysalis concinna в 2012 г. (Egyed L., 2018). Вторую субкладу образовали штаммы из Финляндии *Kumlinge 25-03* (GU183379), *Kumlinge A52* (GU183380) и *Kumlinge 1959* (KT224357) (Whitby J.E., 1993). Прототипный штамм *Kumlinge 1959* был изолирован в 1959 г. из пула клещей *I. ricinus*, собранных на острове *Kumlinge*, Аландские острова, Финляндия (7 м н.у.м.). Штамм *Kumlinge A52* был выделен в 1959 г. из мозга мышей-сосунков, зараженных суспензией из пула клещей *I. ricinus* (14 самок, 12 самцов, 182 нимфы и 93 личинки), собранных на в лесном массиве на острове *Kumlinge* (Uzategui N.Y., 2012). В этом же небольшом лесу в 2003 г. были отловлены клещи *I. ricinus*, от которых был изолирован штамм *Kumlinge 25-03* (Uzategui N.Y., 2012). Несмотря на разницу в изоляции в 40 лет эти штаммы четко кластеризуются в единую кладу в соответствии с местом их изоляции - остров *Kumlinge* (Аландские острова).

Пятый кластер сформировали штаммы из Германии, Финляндии и Чехии. Штамм *K23* (AM600965) из Германии образовал самостоятельную ветвь, которая тесно примыкает к кладе, сформированной штаммами *Sipoo 4, 8, 12, 22, 23* (MK801806, MK801807, MK801808, MK801804, MK801805). Штамм *K23* был изолирован недалеко от города *Karlsruhe*, расположенного в окрестностях реки Рейн недалеко от француско-германской границы (высота над уровнем моря – 116 м) (Ecker M., 1999). А штаммы «*Sipoo*» были изолированы от клещей *I. ricinus*, собранных в 2013 г. на территории архипелага Сипоо, где в 2011 и 2016 гг. были случаи заражения КЭ человека. Филогенетический анализ показал, что штаммы ВКЭ-ЕС, изолированные с архипелага Сипоо, Эспоо и Хельсинки (полуостров Джоллас и остров Исосаари), не группируются вместе, хотя они расположены всего в 20 км друг от друга. Ранее аналогичную закономерность описывали Andersen N.S. и соавторы (Andersen N.S., 2018). Они отмечали, что нуклеотидные последовательности штаммов ВКЭ-ЕС из каждого района Хельсинки, демонстрировали локальную географическую кластеризацию, но при этом изоляты из разных районов не имели общего предка. Штаммы из Эспоо формировали монофилетическую группу, которая группировалась вместе со

штаммами с о. Куутсало (Котка), который расположен примерно в 140 км от Эспоо (Kuivanen S., 2018). Это предполагает наличие как минимум четырех независимых заносов ВКЭ-ЕС в данный регион. Результаты, полученные финскими исследователями, совместно с предположениями о явлениях распространения на большие расстояния, основанными на молекулярно-эпидемиологических исследованиях ВКЭ (Smura T., 2019) и обнаружением ВКЭ у клещей, переносимых перелетными птицами, согласуются с гипотезой о том, что первоначальная интродукция ВКЭ произошла через перелетных птиц с последующим локальным распространением вируса в очагах.

Нами отмечено, что за редким исключением кластеризация штаммов в большей степени зависит от места их изоляции, чем от года и источника выделения. Так, уровень различий по кодирующей области генома между штаммами ВКЭ-ЕС, изолированными на территории Венгрии с 2011 по 2016 гг., не превышает 0,04%. Гомология штаммов из Иркутской области (Восточная Сибирь), выделенных в период с 1971 по 2009 гг. составляет 99,86- 99,99%. В то же время различия между геномами штаммов ВКЭ-ЕС, выделенных в разных точках Финляндии, существенны. Так, уровень различий между штаммами с острова Kuutsalo и штаммов из Espoo, расположенного на берегу Финского залива западнее Хельсинки, составляет 0,9-1,04%. В то время как различия между изолятами ВКЭ-ЕС с острова Kuutsalo в Финском заливе и штаммами из Sipoo из Южной Финляндии и о. Isosaari составляют 2,28-2,38%, уровень различий между штаммами с острова Kumlinge (Аландские острова) и штаммами Sipoo 4, 8, 12, 22, 23 варьирует от 2,37 до 2,41%.

Нами не выявлено прямой корреляционной связи между кластеризацией штаммов на филогенетических деревьях, гомологией нуклеотидных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС и источниками изоляции (рисунки 3.4-3.5). Из рисунка 3.3 видно, что кластеризация штаммов в большей степени зависит от места изоляции, чем от вида клещей, из которых были изолированы штаммы.

клещей *I. ricinus* в Южной Богемии (Чешская Республика) и штамма 126-71 (KY069123), выделенного от клещей *I. persulcatus* составила 98,65 %. Такой же уровень гомологии отмечен между штаммом *Kumlinge* (KT224357), изолированным от клещей *I. ricinus* и штаммом *Змеиногорск-9* (KY069126) от клещей *I. persulcatus*.

Нами также проведен анализ гомологии и кластеризации штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных от больных КЭ людей (Рис. 3.5). Шесть из исследованных десяти штаммов были выделены от пациентов из Чешской Республики в 1953 г. Один штамм был выделен в 1992 г. от больного клещевым энцефалитом человека в Словении (*Ljubljana*), один штамм (*Kuutsalo-2015*) был изолирован из мозжечка больного КЭ человека в 2015 г. Штамм *IG-98* был изолирован из сгустка крови больного в 1998 г. на территории Иркутской области. Штаммы *Absettarov* и *IG-98* из России образовали общую кладу, хотя были изолированы от больных людей в разных точках России (Ленинградская и Иркутская области) с разрывом более чем в 40 лет. Уровень различий в гомологии этих двух штаммов составил 1,68%. В то время как штаммы из Чешской Республики, выделенные в 1953 г. вошли в состав разных клад. Например, штаммы *Skrivanek* и *Hupr* из Чешской Республики, изолированные в один и тот же год, отличались меньшей гомологией (97,32%).

Достаточно высокий уровень различий был зафиксирован между штаммом *Kuutsalo*, выделенным в 2015 г. из мозжечка мужчины, погибшего от КЭ в Финляндии, и штаммом *Hupr* (1953 г.) – 2,6%.

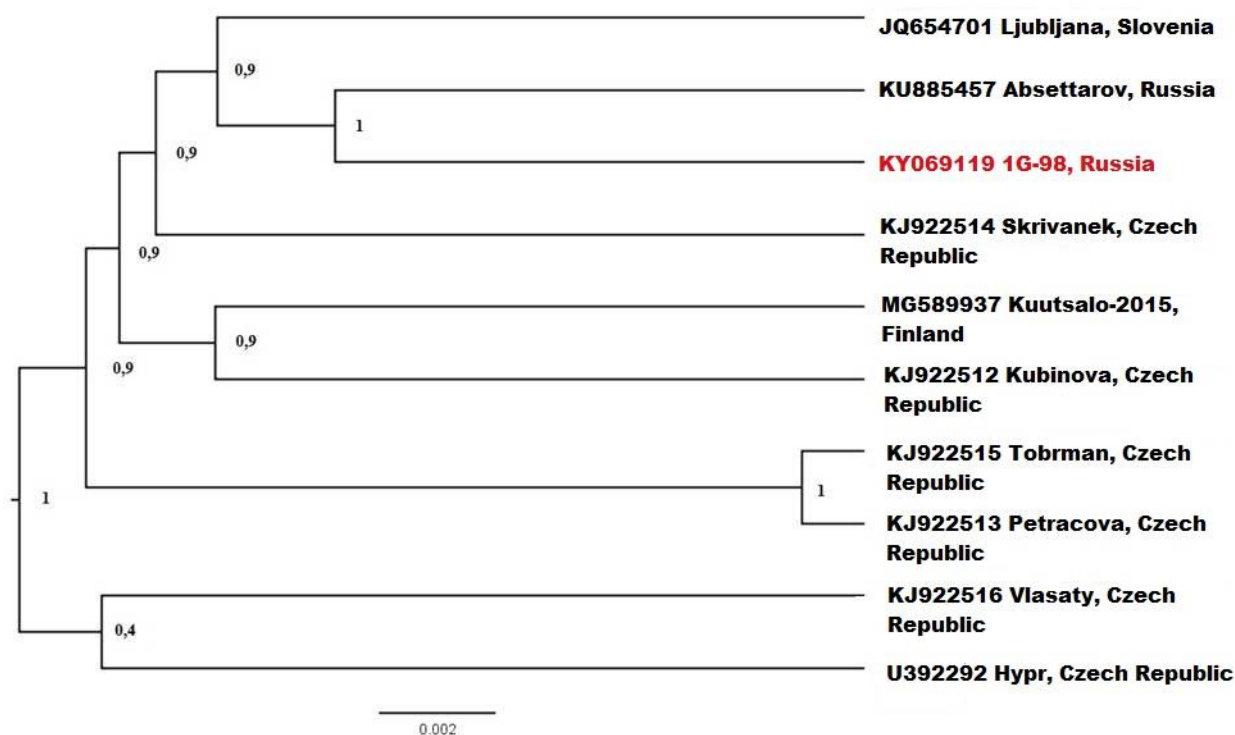


Рисунок 3.5 - Филогенетическое древо ВКЭ-ЕС, построенное на основе 10 полногеномных последовательностей (10245 п.н.) штаммов, выделенных от больных людей с помощью метода Bayesian Markov chain Monte-Carlo в пакете программ BEAST v. 1.10.4.

Таким образом, в результате анализа геномов штаммов ВКЭ-ЕС из электронных баз данных нами показано, что уровень различий между нуклеотидными последовательностями кодирующей части генома у ВКЭ-ЕС и другими субтипами вируса сопоставим или даже превышает уровень различий между штаммами ВКЭ-ЕС и вирусами подгрупп Турецкого и Шотландского энцефалита.

Показано, что различия, как в кодирующей области генома, так и в соответствующей ей последовательности полипротеина у штаммов ВКЭ-ЕС, как правило, минимальны (3,1 и 1,5% соответственно) по сравнению с другими субтипами вируса, что свидетельствует о более высокой степени генетической однородности данного варианта вируса. Исключение составляют два штамма, изолированные на территории Нидерландов (*NL-LC171402*) и

Великобритании(*UK-Hampshire2019* - MN661145), существование которых значительно расширяет установленные ранее границы вариабельности внутри данного субтипа приблизительно от 3% до 9%.

Анализ гомологии штаммов ВКЭ-ЕС показал, что максимальный уровень сходства, как правило, наблюдается между штаммами, выделенными в одном регионе (уровень различий <1%).

Нами не отмечено связи между уровнем гомологии нуклеотидных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС от времени и источника их изоляции (клещи, больные КЭ люди). Высказано предположение о том, что кластеризация исследуемых штаммов на дендрограммах зависит в большей степени от территории их изоляции, нежели от источника их изоляции.

ГЛАВА 4

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО В ЗАПАДНОЙ И ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

ВКЭ-ЕС имеет обширнейший ареал, простирающийся от Европы до Азии. Данный субтип ВКЭ циркулирует в экосистемах значительно различающихся составом природных комплексов и биоценозов. В связи с этим, значительный научный интерес представлял сравнительный анализ генетических свойств штаммов ВКЭ-ЕС из удаленных друг от друга точек ареала (территория Сибири и Европы), существенно отличающихся биоценотической структурой природных очагов.

Для этих целей нами были расшифрованы полногеномные последовательности восьми штаммов ВКЭ-ЕС из Сибири. Сведения о данных штаммах приведены в главе 2 (Табл. 2.1).

Кроме того, в выборку штаммов из Сибири мы также включили четыре штамма из Восточной Сибири – *IrkutskBR99-08* (KP331441), *IrkutskBR1456-09* (KP331443), *IrkutskBR1434-09* (KP331442), *Sorex 18-10* (KP938507) (Adelshin R.V., 2015) и один штамм *84.2* из Алтая (HM120875).

При сравнении полученных нами данных с последовательностями, имеющимися в GenBank (всего 140 полногеномных последовательностей, из них 39 – ВКЭ-ЕС), было установлено, что исследуемые штаммы вошли в состав группы ВКЭ-ЕС (Рис. 4.1). При сопоставлении вновь расшифрованных последовательностей между собой оказалось, что штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири образуют две группы, соответствующие географическому положению мест их изоляции, условно обозначенные нами как западносибирский и восточносибирский варианты (Рис.4.1).

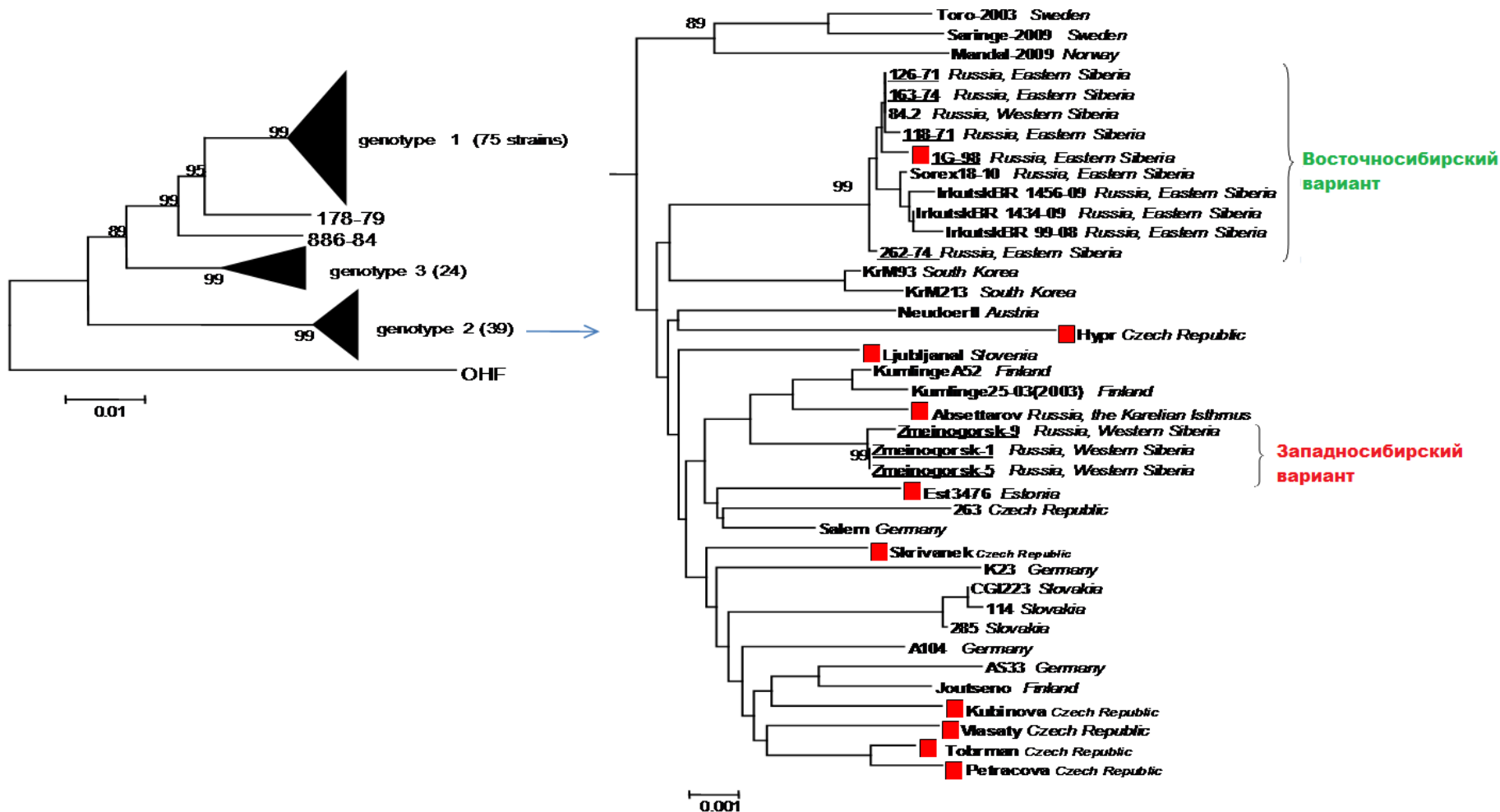


Рис. 4.1 - Результаты сопоставления кодирующей области 140 полногеномных последовательностей ВКЭ с помощью компьютерной программы MEGA6 (Tamura K., 2013) методом объединения ближайших соседей с использованием 2-параметрической модели Кимуры. Штаммы, полногеномные последовательности, расшифрованные в ходе данного исследования, подчеркнуты. Штаммы от больных КЭ людей отмечены красными квадратами.

Длина генома у штаммов западносибирского и восточносибирского варианта существенно не отличалась и составила 10 825 и 10 905 нуклеотидов соответственно. Геномные структуры исследуемых штаммов в 5'-некодирующей области содержали по 132 нуклеотида (100% гомологии в обеих группах и 3% различий между группами) (Рис. 4.2) и 10 242 нуклеотида в области, кодирующей полипротеин-предшественник трех структурных и семи неструктурных вирусных белков (>99,9% гомологии внутри групп и 99,9% гомологии между группами).

3'-UTR исследуемых геномов был сопоставим по длине и структуре с аналогичной областью штамма *HuPr* (461 н.о.) и составил для штаммов ВКЭ-ЕС из Западной Сибири 451 н.о., а для штаммов из Восточной Сибири 531 н.о. (Рис. 4.2).

К штаммам восточносибирского варианта ВКЭ-ЕС генетически наиболее близкими оказались штаммы из Южной Кореи. Штаммы из Западной Сибири на дендрограмме группировались со штаммами ВКЭ-ЕС из Европы. Гомология западносибирских и восточносибирских штаммов с прототипным штаммом ВКЭ-ЕС *Neudoerfl* составила 97,6% и 97,4% соответственно. Группу восточносибирских штаммов составили девять штаммов из Иркутской области и Алтайский штамм 84.2 (HM120875). Различия по кодирующей области генома в этой группе не превышали 0,5%. В группу западносибирского варианта вошли алтайские штаммы *Zmeinogorsk-1*, *Zmeinogorsk-5* и *Zmeinogorsk-9* (различия менее 0,1%). Наиболее близким к ним по уровню гомологии оказался штамм *Absettarov* (KJ000002) (99,3% гомологии по кодирующей области генома со штаммами из Змеиногорска и 97,7% - со штаммом *Neudoerfl*).

	10	20	30	
1G-98	AGATTTTCTT	GCACGTGCGT	GCGTTTGCTT	CGGACA
118-71
126-71
163-74
262-74
Sorex 18-1
IrkutskBR_1456-09
IrkutskBR_1434-09C.....
IrkutskBR_99-08C.G.G
82.4	*****	*****
Zmeinogorsk-1A.	..T.
Zmeinogorsk-5A.	..T.
Zmeinogorsk-9A.	..T.
HyprG.
NeudoerflA.

	60	70	80	
1G-98'	TGGTTTGAAA	GAGATATCT	TTGTTTCTA	CCAGTC
118-71'
126-71'
163-74'
262-74'
Sorex 18-1
IrkutskBR_1456-09
IrkutskBR_1434-09
IrkutskBR_99-08
82.4
Zmeinogorsk-1C.
Zmeinogorsk-5C.
Zmeinogorsk-9C.
HyprA.T.
Neudoerfl

	110	120	130	
1G-98	GAAAAGACAG	CTTAGGAGAA	CAAGAGCTGG	GG
118-71
126-71
163-74
262-74
Sorex 18-1
IrkutskBR_1456-09
IrkutskBR_1434-09
IrkutskBR_99-08
82.4
Zmeinogorsk-1	A.....
Zmeinogorsk-5	A.....
Zmeinogorsk-9	A.....
Hypr	A.....
Neudoerfl	A.....

Рисунок 4.2 - Сравнение 5'-UTR генома у 13 штаммов ВКЭ-ЕС из Восточной и Западной Сибири и двух штаммов из Европы (*Hypr* и *Neudoerfl*).

Примечание: Точки указывают на наличие гомологии последовательностей, а звездочки - на отсутствие данных.

Гомология восточносибирских и западносибирских штаммов варьировала в пределах от 98,27 до 98,43%. Минимальный уровень различий был зарегистрирован между штаммами *163-74* и *Змеиногорск-5*, максимальный - между штаммами *IrkutskBR99-08* и *Змеиногорск-9*.

Среди восточносибирских штаммов максимальный уровень различий отмечался между штаммом *1G-98* и штаммом *IrkutskBR99-08* (0,21%) (Табл. 4.1). Минимальный уровень генетических различий наблюдался между штаммами *163-74* из Иркутской области и штаммом *84.2* из Алтая (0,01%). Примечательно, что точно такой же уровень различий был зафиксирован и между штаммами *126-71* и *164-74*, выделенными в одном и том же районе Иркутской области (Эхирит-Булагатском), но в разные годы. Нами отмечено, что уровень генетических различий между штаммами *118-71* и *126-71* 1971 года изоляции и штаммом *Sorex-18-10* самой поздней по времени изоляции (2010 г.) составил 0,11% и 0,13% соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о высокой степени стабильности генома у ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Восточной Сибири.

Проведен сравнительный анализ 39 полипротеиновых последовательностей длиной 3414 а.о. ВКЭ-ЕС из международной электронной базы данных GenBank и 13 штаммов из Сибири. Нами установлено, что восточносибирский и западносибирский варианты ВКЭ-ЕС однозначно расходятся по сочетаниям аминокислотных замен в 29 позициях в 9 из 10 белков вируса (Табл. 4.2). В белке Е выявлена всего одна такая позиция (E₂₄₆). Штаммы, изолированные до 2000х гг. По позициям E₂₁ и E₃₃₅ можно выделить два субварианта, которые различаются датами изоляции. У штаммов из Восточной Сибири с более поздними сроками изоляции (выделены после 2000х гг.) в указанных позициях валин и треонин заменены на изолейцин (*Val→Ile* и *Thr→Ile*), можно предположить, что, свидетельствует в пользу возможной дивергенции сибирской популяции ВКЭ-ЕС.

Ни одной замены не обнаружено только в белке NS2B, что может быть связано с важной ролью, которую он играет в репродукции ВКЭ.

Таблица 4.1 - Уровень различий по кодирующей области генома у штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа из Восточной и Западной Сибири

штамм	84.2	<i>IrkutskBR99-08</i>	<i>IrkutskBR1456-09</i>	<i>Sorex-18-10</i>	<i>IrkutskBR1434-09</i>	<i>Zmeinogorsk-9</i>	<i>Zmeinogorsk-5</i>	<i>Zmeinogorsk-1</i>	<i>126-71</i>	<i>262-74</i>	<i>163-74</i>	<i>118-71</i>
<i>IrkutskBR99-08</i>	0,14%	*										
<i>IrkutskBR1456-09</i>	0,13%	0,17%	*									
<i>Sorex-18-10</i>	0,11%	0,15%	0,12%	*								
<i>IrkutskBR1434-09</i>	0,08%	0,12%	0,09%	0,09%	*							
<i>Zmeinogorsk-9</i>	1,61%	1,73%	1,68%	1,70%	1,65%	*						
<i>Zmeinogorsk-5</i>	1,58%	1,70%	1,65%	1,67%	1,62%	0,05%	*					
<i>Zmeinogorsk-1</i>	1,58%	1,70%	1,65%	1,67%	1,62%	0,05%	0,02%	*				
<i>126-71</i>	0,02%	0,14%	0,13%	0,11%	0,08%	1,61%	1,58%	1,58%	*			
<i>262-74</i>	0,07%	0,17%	0,16%	0,14%	0,11%	1,66%	1,63%	1,63%	0,07%	*		
<i>163-74</i>	0,01%	0,13%	0,12%	0,10%	0,07%	1,60%	1,57%	1,57%	0,01%	0,06%	*	
<i>118-71</i>	0,04%	0,16%	0,15%	0,13%	0,10%	1,63%	1,60%	1,60%	0,04%	0,09%	0,03%	*
<i>IG-98</i>	0,12%	0,21%	0,21%	0,19%	0,16%	1,71%	1,68%	1,68%	0,12%	0,15%	0,11%	0,14%

Таблица 4.2 - Аминокислотные замены у 13 штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа из Сибири

позиция	Европейский субтип		Западная Сибирь			Восточная Сибирь											
			Zmeinogorsk-1	Zmeinogorsk-5	Zmeinogorsk-9	84.2	1G-98	118-71	126-71	163-74	262-74	Sorex 18-10	IrkutskBR 1456-09	IrkutskBR 1434-09	IrkutskBR 99-08		
C-31	V	A	A	A	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
C-77		K	K	K	K	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
prM-147		L	L	L	L	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
prM -159		V	A	A	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
prM -163		L	L	L	S	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
E-21		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	I	I	I	I	I
E-47		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S	A	A	A	A
E-67		D	D	D	D	D	G	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
E-246		A	V	V	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
E-335		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	I	I	I	I	I
NS1-154		F	L	L	L	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
NS1-174		E	E	E	E	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
NS1-237		V	V	V	V	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
NS1-287	T	V	A	I	I	I	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
NS1-294		K	R	R	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
NS2A-42		V	I	I	I	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
NS2A-53	I	M	I	I	I	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
NS2A-124	S	N	S	S	S	G	E	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
NS2A-141		I	I	I	I	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
NS3-33	F	L	L	L	L	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
NS3-247		R	R	R	R	R	R	K	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NS3-447		T	T	T	T	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
NS4A-32		H	R	R	R	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
NS4A-54		M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	I	M	M	M	M
NS4A-55	V	A	V	V	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
NS4A-121		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	D
NS4A-126		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	T
NS4B-21	Q	R	Q	Q	Q	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NS4B-56		I	I	I	I	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
NS4B-119	L	F	L	L	L	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
NS4B-250		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	S	G	G	G	G	G
NS5-101	R	K	K	K	K	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NS5-290	S	N	G	G	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NS5-329		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	F	L	L	L	L
NS5-434	H	R	Q	R	R	R	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
NS5-521	K	R	K	K	K	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
NS5-699	A	V	A	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
NS5-701	F	L	L	L	L	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
NS5-724	A	T	S	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
NS5-786	V	A	V	V	I	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
NS5-897	R	K	K	K	K	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Примечание. В группе ВКЭ-ДВ сопоставлены полипротеиновые структуры 75 штаммов, в группе ВКЭ-Сиб - 24, а в группе ВКЭ-ЕС - 26. Голубым цветом выделены нехарактерные для ВКЭ-ЕС замены; красным цветом – уникальные (штаммспецифические) замены.

Белок NS2В образуя комплекс с белком NS3, обеспечивает его правильную конформацию, и действует как кофактор для вирусной сериновой протеазы NS2В-NS3 (Perera R., 2008). Также было обнаружено, что белок NS2В локализован в областях синтеза вирусной РНК и способен реагировать с белком NS5 и 3'-некодирующей областью генома, что позволяет предположить, что он играет важную роль в репликации вируса (Chambers T.J., 1993). Следовательно, любые изменения в аминокислотной последовательности белка NS2В, с большой долей вероятности, приведут к изменению сайта связывания с NS3 и потере протеазной активности, что усложнит репродукцию вируса.

Нами показано, что у отдельных штаммов число уникальных аминокислотных замен варьирует от 0 до 2. У штамма *IG-98* выявлено две замены: одна в белке E (D67G) и одна в белке NS2A (G124E). У штамма *I18-71* зафиксирована одна замена в белке NS3₂₄₇ (R→K). У штамма *262-74* в позиции 250 белка NS4В вместо глицина, как у всех европейских штаммов находится серин, что характерно для представителей дальневосточного и сибирского субтипов. У штамма *Sorex 18-10* в позиции E₄₇ аланин заменен на серин (Ala→Ser). Штаммы *IrkutskBR 1456-09* и *IrkutskBR 99-08* имеют по две уникальных замены. У первого из них в позиции 54 белка NS4А метионин замещен на изолейцин (Met→Ile), а в позиции NS5₃₂₉ вместо лейцина находится фенилаланин (Leu→Phe). У второго штамма в позиции NS4А₁₂₁ (Glu→Asp), а в позиции NS4А₁₂₆ аргинин заменен на треонин (Arg→Thr). У штамма *Zmeinogorsk-9* обнаружена одна уникальная замена в позиции prM₁₆₃ - Leu→Ser.

Специфических замен соответствующих определенному источнику выделения кроме замены D→G (Asp→Gly) в позиции E₆₇ у штамма *IG-98*, нами не выявлено. Мутация D67G в белке E ранее была описана Л.И. Козловской и соавт. на примере клона 18А штамма *Absettarov* ВКЭ-ЕС, полученного путем клонирования вируса после четырех пассажей в культуре клеток СПЭВ (Козловская Л.И., 2013). Было установлено, что, так же как и

родительский штамм, клон 18А сохранял высокую вирулентность для мышей, гемагглютинирующую активность в отношении эритроцитов гуся и способность к формированию крупных бляшек в культуре клеток (Козловская Л.И., 2013). D67G-мутация в белке E также наблюдалась у семи штаммов ВКЭ-ДВ (шесть выделены от больных КЭ людей и один - от грызуна) и одного штамма ВКЭ-Сиб, изолированного от пациента, умершего в 2001 г. от КЭ (*Yar46-2* (EU444079)). Исследователи выявили, что в результате такой замены увеличивается суммарный заряд и гидрофобность поверхности вириона ВКЭ-Сиб, теряется гемагглютинирующая способность вируса. Штаммы ВКЭ-ДВ с такой мутацией были выделены в 1943 г. в северо-западном регионе России (*Volkhov-Knromov* (FJ214114)) и в 1942 и 1943 гг. на Урале (*T-blood* (AF091019), *Ural-Nina* (FJ214119), *Ural-Ponomarev* (FJ214118), *Ural-Belyaeva* (FJ214117) и *Ural-Antipov* (FJ214115)), а также в Эстонии в 1998 г. от *Apodemus agrarius* (*Est2546* (DQ393779)).

Сравнительный анализ полученных нами результатов с данными из GenBank показал, что замена А→S (*Ala*→*Ser*) в позиции E₄₇, обнаруженная у восточносибирского штамма *Sorex18-10*, имеется и у прототипного штамма Байкальского субтипа 886-84 и еще у двух представителей ВКЭ-ЕС. Это изоляты из клещей *I. ricinus* - *Bul_175_10* (изолирован в 2008 г., KC154175) из Германии и *LU_Dagmarsellen3* (2008 г. изоляции, NM468144) из Швейцарии. Нами показано, что замена А→V (*Ala*→*Val*) в позиции E₂₄₆ у штаммов из Змеиногорска Алтайского края имеется у изолята 2201 (KC292217), полученного из пула клещей, собранных в Германии.

На основании анализа нами сделан вывод, что значимая аминокислотная замена D→G в позиции E₆₇ выявляется у представителей всех трех основных субтипов ВКЭ. Нами отмечено, что такая замена обнаружена только у штаммов ВКЭ, изолированных от больных КЭ людей и грызунов.

Таким образом, в результате проведенного нами исследования впервые описаны генетические особенности ВКЭ-ЕС, циркулирующего на

территории Сибири. Показано, что штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири имеют высокую степень генетического сходства со штаммами из европейской части ареала и с представителями из Южной Кореи. Сибирская популяция ВКЭ-ЕС на обследованных территориях представлена двумя линиями (западносибирский и восточносибирский варианты). Эти линии отличаются по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B. Отмечена высокая степень стабильности генома у популяции ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Сибири.

ГЛАВА 5

ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕНОТИПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ

Наряду с установлением генетической структуры штаммов ВКЭ-ЕС, выделенных на территории Западной и Восточной Сибири, мы сочли необходимым оценить их фенотипические характеристики, которые являются важной составляющей в полной мере характеризующей природу и свойства вируса и важны с точки зрения практической вирусологии.

В первую очередь мы определили фенотипические признаки, связанные с особенностями внутриклеточной репродукции ВКЭ, к которым относятся: цитопатическая активность, размер и характер бляшек в культуре клеток под агаровым покрытием (S-признак), способность к репродукции при различных температурах (rct- или ts-признак).

Для оценки S-признака использовали микрометод определения бляшек в культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) в 24-луночных планшетах под агаровым покрытием. Бляшки появлялись на 3-4-е сутки после заражения клеток СПЭВ штаммами ВКЭ-ЕС. Учет реакции проводили на 5-е сутки после заражения, когда бляшки увеличивались в размере и становились более отчетливыми и прозрачными. Для получения более достоверных результатов опыты повторяли 3-4 раза.

Сведения о бляшкообразующей активности (S-признак) четырех штаммов ВКЭ-ЕС из Восточной Сибири представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 - Результаты определения генетического S-признака штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа

Штамм	Источник изоляции	Размер бляшек	S-признак
<i>134-71</i>	Суслик длиннохвостый	1,5-2,0	-
<i>118-71</i>	Суслик длиннохвостый	3,5	+
<i>272-75</i>	Полевка узкочерепная	1,5-2,0	-

898-84	Красная полевка	3,5-5,0	+
--------	-----------------	---------	---

Размер бляшек у исследованных нами штаммов варьировала от 1,5-2,0 до 5,0 мм в диаметре. Два штамма *134-71* и *272-75* формировали только мелкие бляшки диаметром 1,5-2,0 мм (S^- -признак). Два других штамма (*118-71* и *898-84*) образовывали крупные бляшки диаметром 3,5 мм и 3,5-5,0 мм соответственно (S^+ -признак). Сходные данные получены Gaumann R. и соавт. при исследовании изолятов ВКЭ-ЕС из Швейцарии. Они также показали гетерогенность штаммов ВКЭ-ЕС по данному признаку. Большая часть изученных ими штаммов формировала смесь бляшек разного диаметра. Интересно, что бляшки небольшого размера были ассоциированы со штаммами, изолированными в природных очагах, где заболеваемость КЭ отсутствует или регистрируются только спорадические случаи заболевания (Gäumann R., 2011).

Следующим шагом в изучении штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных на территории Восточной Сибири, было определение генетических маркеров gct_{37} и gct_{42} и терморезистентности (T_{50}), который связан со свойствами белковой оболочки вирионов и обеспечивает устойчивость штаммов к прогреванию.

Исследованные нами штаммы ВКЭ-ЕС за исключением *118-71*, хорошо размножались в культуре клеток СПЭВ при 37°C и 42°C, вызывая разрушение клеточного монослоя на 4-6-е сутки. Показатель lg ТЦД₅₀/мл при 37°C варьировал в диапазоне от 4,23 до 8,78 (Табл. 5.2).

Таблица 5.2 - Результаты определения генетических маркеров gct_{37} , gct_{42} и T_{50} штаммов ВКЭ-ЕС

штамм	Источник изоляции	Генетические признаки				
		lgТЦД 50/мл при 37°C	gct_{42}		T_{50}	
			Разница в lgТЦД 50/мл при 37°- 42°C	Выражен- ность признака	Индекс инактивации в lgТЦД 50/мл при 50°C	Выражен- ность признака
<i>IG-98</i>	кровь больного	5,0	1,0	+	1,0	+
<i>898-84</i>	красная полевка	4,23	-0,1	+	1,23	+

118-71	суслик длиннохвостый	8,78	3,27	-	1,61	+
134-71	суслик длиннохвостый	8,6	0	+	4,6	-
272-75	полевка узкочерепная	7,0	-0,13	+	1,52	+

Нами было показано, что четыре штамма (*1G-98*, *898-84*, *134-71*, *272-75*) активно размножались при супраоптимальной температуре 42°C (rct_{42}^+), что свидетельствует об их высоком адаптационном потенциале. Штамм *118-71* обладал rct_{42}^- - признаком, он хуже размножался при температуре 42°C.

Результаты определения индекса инактивации штаммов показали, что штаммы *1G-98*, *898-84*, *272-75*, *118-71* оказались терморезистентными (T_{50}^+), а штамм *134-71* оказался термолабильным (T_{50}^-).

Одной из наиболее важных биологических характеристик вирусов являются их патогенные свойства. Для оценки степени вирулентности штаммов ВКЭ-ЕС использовали три показателя: 1) средний инфекционный титр при заражении беспородных белых мышей массой 5-7 г в мозг (mNic); 2) титр при подкожном заражении (mNsc); 3) индекс инвазивности (*II*).

Результаты заражения лабораторных животных показали, что четыре штамма ВКЭ-ЕС (*1G-98*, *898-84*, *262-74* и *126-71*) проявляли высокую церебральную и периферическую активность (Табл. 5.3). При определении индекса инвазивности было установлено, что он у данных штаммов был менее 3,0, что указывает на их потенциальную способность преодолевать гематоэнцефалический барьер, достигать ЦНС и репродуцироваться в ней.

Таблица 5.3 - Результаты определения индекса инвазивности штаммов ВКЭ-ЕС

штамм	Источник изоляции	mNic (lgLD ₅₀ /мл)	mNsc (lgLD ₅₀ /мл)	mNic- mNsc	<i>II</i>
<i>1G-98</i>	кровь больного	8,72	6,35	2,37	+
<i>898-84</i>	красная полевка	9,32	6,9	2,42	+
<i>262-74</i>	<i>I. persulcatus</i>	10,4	10,1	0,3	+
<i>126-71</i>	<i>I. persulcatus</i>	11,0	8,8	1,2	+
<i>163-74</i>	<i>I. persulcatus</i>	9,5	6,4	3,1	-
<i>118-71</i>	суслик длиннохвостый	10,3	6,6	3,7	-

<i>Змеиногорск-1</i>	<i>I. persulcatus</i>	11,5	8,3	3,2	-
<i>Змеиногорск-7</i>	<i>I. persulcatus</i>	8,7	5,2	3,5	-

Сходные данные были получены Адельшиным Р.В. и соавт. Так, при изучении вирулентности четырех штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных на территории Прибайкалья (Adelshin R.V., 2015) все изученные авторами штаммы характеризовались высокой церебральной (9,0-10,8 lgLD₅₀/мл) и периферической активностью (7,1-8,9 lgLD₅₀/мл), индекс инвазивности варьировал в пределах от 0,9 до 2,4.

Штаммы *Змеиногорск-1* и *Змеиногорск-7* и два штамма из Восточной Сибири (*118-71* и *163-74*) характеризовались высокой нейровирулентностью, но проявляли низкую периферическую активность. Gaumann R. и соавт. отмечали, что все шесть из исследованных ими штаммов ВКЭ-ЕС, выделенных в Швейцарии, характеризовались высокой нейровирулентностью, но при этом три из них обладали средней нейроинвазивностью, два - низкой степенью инвазивности и один штамм не вызывал развития инфекции при периферическом введении (Gäumann R., 2011). Штаммы ВКЭ-ЕС, характеризующиеся высокой нейровирулентностью, но ослабленной периферической активностью ранее были также описаны в Чешской Республике (Korecky J., 1991; Ruzek D., 2008). Было высказано предположение, что ослабление нейроинвазивности у этих изолятов вызвано задержкой кинетики репликации вируса, что позволяет иммунной системе избавляться от инфекции до того, как вирус достигнет центральной нервной системы (Hurrelbrink R.J., 2003).

Для характеристики вирулентных свойств штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных на территории Восточной и Западной Сибири, нами также были определены такие показатели, как средняя продолжительность жизни (СПЖ) и процент летальности мышей, зараженных интрацеребрально (Табл. 5.4).

Процент летальности мышей, зараженных штаммами ВКЭ-ЕС, изолированными на территории Восточной Сибири был достаточно высоким

и варьировал в диапазоне от 80 до 100%. Средняя продолжительность жизни мышей составила от 4,4 до 6,03 дней.

Показатели продолжительность жизни мышей, зараженных штаммами ВКЭ-ЕС, выделенными на территории Западной Сибири, были аналогичны показателям СПЖ у мышей, зараженных штаммами, изолированными на территории Восточной Сибири. Но при этом эти штаммы проявляли более высокую летальность для лабораторных мышей.

Таблица 5.4 - Результаты определения средней продолжительности жизни и процента летальности мышей, зараженных штаммами ВКЭ-ЕС

Штамм	Источник изоляции	Количество дней	СПЖ	Летальность		
				Всего заражено	Погибло	% гибели
Штаммы, изолированные на территории Восточной Сибири						
134-71	суслик длиннохвостый	130	5,4	25	24	96,0
118-71	суслик длиннохвостый	131	5,7	25	23	92,0
272-75	полевка узкочерепная	193	6,03	38	32	84,2
898-84	красная полевка	110	5,8	20	19	95,0
1G-98	кровь больного	146	5,0	29	29	100,0
126-71	<i>I. persulcatus</i>	88	4,9	20	18	90,0
163-74	<i>I. persulcatus</i>	87	4,6	19	19	100,0
262-74	<i>I. persulcatus</i>	40	4,4	10	9	80,0
Штаммы, изолированные на территории Западной Сибири						
Змеиногорск-1	<i>I. persulcatus</i>	26	5,2	5	5	100,0
Змеиногорск-3	<i>I. persulcatus</i>	54	5,4	10	10	100,0
Змеиногорск-5	<i>I. persulcatus</i>	57	4,75	15	12	80,0
Змеиногорск-7	<i>I. persulcatus</i>	68	4,86	14	14	100,0
Змеиногорск-9	<i>I. persulcatus</i>	63	6,3	10	10	100,0

Изучение нейрпатогенности штаммов ВКЭ-ЕС из Швейцарии показало, что они обладали 100% летальностью для лабораторных мышей, гибель которых наблюдалась на 7-9 день с момента интрацеребральной инокуляции вируса (Gäumann R., 2011).

Общепринято считать, что изоляты ВКЭ, полученные от иксодовых клещей, являются нейрпатогенными и вызывают летальные инфекции у мышей после интрацеребрального и периферического введения вируса

(Mandl C.W., 2005). При характеристике вирулентности, основанной на фенотипе бляшек в клетках млекопитающих, изоляты ВКЭ от клещей часто представляют собой гетерогенную популяцию вариантов, продуцирующих бляшки разного размера (Mayer V., 1969). В научной литературе также описано, что адаптированные к клещам варианты ВКЭ не только продуцируют небольшие по размеру бляшки, демонстрируя медленную скорость репликации в культуре клеток, но и снижение нейроинвазивного потенциала у лабораторных мышей. Напротив, адаптация вируса к млекопитающим приводит к увеличению размера бляшек и усилению нейроинвазивности (Romanova L., 2007; Ruzek D., 2008).

В нашем исследовании размер бляшек в культуре клеток СПЭВ был определен только у штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных от мелких млекопитающих. Изученные штаммы оказались гетерогенными по данному признаку, формируя как мелкие, так и крупные бляшки. Все штаммы, изолированные от мелких млекопитающих, характеризовались высокой нейровирулентностью для лабораторных мышей. Процент летальности варьировал от 84,2 до 100%. Два из трех исследуемых штаммов (*IG-98*, *898-84*) были высокоинвазивными ($P < 3$), один (*118-71*) обладал сниженной инвазивной активностью. Нами не отмечено прямой связи между вирулентностью штамма и размером формируемых им бляшек. Об отсутствии такой закономерности уже сообщалось Gritsun T.S. и соавт. на примере штаммов ВКЭ-Сиб. Было показано, что штаммы ВКЭ со сниженной вирулентностью штамма *in vivo* образуют большие бляшки *in vitro*, а небольшие бляшки иногда связаны с высоковирулентными штаммами (Gritsun T.S., 1993, 2003). О необязательном совпадении нейрпатогенных свойств исследуемых изолятов *in vivo* и фенотипом бляшек, описанным в экспериментах *in vitro*, сообщал Gäumann R. и соавт. (Gäumann R., 2011). Так изолят *ZH Langnau a.A.1*, демонстрирующий ослабленный фенотип *in vivo* (не нейроинвазивный), в экспериментах *in vitro* был охарактеризован как высоковирулентный (большие по размеру бляшки).

Штаммы, выделенные от клещей *I. persulcatus* в нашем исследовании характеризовались высоким уровнем нейровирулентности. Процент летальности лабораторных животных варьировал от 80 до 100%. При этом только два из пяти исследованных штаммов от клещей проявляли высокую нейроинвазивную активность.

По мнению ряда авторов, общим свойством высоковирулентных штаммов ВКЭ является присутствие протяженных делеций в 3'-некодирующей области генома, а полноразмерная 3'-некодирующая область необходима для выживания ВКЭ в клетках клещей (Wallner G, 1995; Ruzek D., 2008; Belikov S., 2014). Первоначально, основываясь на экспериментах, в которых поли (А) или полная переменная часть 3'-некодирующей области генома ВКЭ были укорочены или удалены, было сделано предположение, что такие варианты последовательностей не оказывают существенного эффекта на свойства вируса (Mandl C.W., 1998). Однако недавно Sakai M. и соавт. было показано, что делеции в переменной части 3'-некодирующей области генома могут являться фактором вирулентности, увеличивающим репродукцию вируса в мозге и его патогенность для мышей (Sakai M., 2014). Большие делеции в 3'-некодирующей области включая обширные делеции, затрагивающие практически полностью данный участок генома наблюдались в штаммах ВКЭ, выделенных от пациентов на Дальнем Востоке (Belikov S., 2014). Опыты, проведенные Ruzek D. и соавт., также подтверждали данную закономерность. Авторами был использован аттенуированный штамм ВКЭ (263), выделенный от полевых клещей, который затем пятикратно пассировали в мозге лабораторных мышей или культивировали при температуре 40°C в культуре клеток СПЭВ (Ruzek D., 2008). В результате исследований были получены два независимых штамма - 263-*m5* и 263-*TR* с идентичными геномами. Оба штамма демонстрировали увеличение размеров бляшек на культуре клеток СПЭВ, повышение нейроинвазивности и резистентности к температуре. Секвенирование и сравнение с родительским аттенуированным штаммом выявило две уникальные аминокислотные

замены, расположенные в белках NS2b и NS3, а также протяженную делецию в 3'-некодирующем участке генома (Ruzek D., 2008). Была высказана гипотеза, что в дополнение к мутациям в белках NS2B и NS3 делеция в 3'-некодирующей области также способствует увеличению нейроинвазивности штаммов 263-*m5* и 263-*TR* (Ruzek D., 2008). Было отмечено, что делеции в 3'-некодирующей области генома ВКЭ наблюдались только у штаммов, изолированных от человека и отсутствовали у штаммов, выделенных от клещей и грызунов.

В нашей работе был осуществлен сравнительный анализ последовательностей 3'-некодирующих областей генома восьми штаммов ВКЭ-ЕС из Западной и Восточной Сибири. В качестве группы сравнения были взяты штаммы *Neudoerfl* (U27495) (изолирован от клещей *I. ricinus* в 1971 г. в Австрии) и *Huyp* (U39292) (выделен в 1953 г. из крови больного ребенка из Чехословакии) (Wallner G., 1996), а также штаммы ВКЭ-ЕС, изолированные в 1953 г. от больных людей из Чехии (Formanová P., 2014).

Было показано, что все исследуемые штаммы из Сибири имеют делеции в варибельной части 3'-некодирующей области генома (Рис. 5.1). Размер делеций и их количество у штаммов из Сибирского региона варьировал. Первая делеция была выявлена как у штаммов из Западной Сибири, так и из Восточной. По длине она была аналогична таковой у штамма *Huyp* (235 нуклеотидов). Вторая делеция наблюдалась только у штаммов, выделенных на территории Западной Сибири (*Змеиногорск-1*, 5, 9). По длине она превышала таковую у штамма *Huyp* (80 и 70 нуклеотидов соответственно). Самые протяженные делеции были выявлены у штаммов *Kubinova* (351) и *Vlasaty* (318), которые были выделены от больных людей в Чехословакии. Штамм *Kubinova* также имел небольшие делеции в консервативной части 3'-некодирующей области генома. Необходимо отметить, что делеции в варибельной части 3'-некодирующей области генома имели как высоковирулентные для лабораторных мышей штаммы из Сибири (*IG-98*, 262-74, 127-71), так и изоляты, обладающие низкой степенью

инвазивности (163-74, 118-71, Змеиногорск-1,-7). Делеции были выявлены как у штаммов, изолированных от людей и мелких млекопитающих, так и от клещей *I. persulcatus*.

```

Neudoerfl_ (U27495) ACCCAGACTGTGACAGAGCAAACCCGGAGGGCTCGTAAAAGATTGTC [48]
Hypr_ (U39292) ACCCAGACTGTGACAGAGCAAACCCGGAGGGCTCGTAAAAGATTGTC [48]
118-71 ACCCAGACTGTGACAGAGCAAACCCGGAGGGCTCGTAAAAGATTGTC [48]
126-71 ACCCAGACTGTGACAGAGCAAACCCGGAGGGCTCGTAAAAGATTGTC [48]
163-74 ACCCAGACTGTGACAGAGCAAACCCGGAGGGCTCGTAAAAGATTGTC [48]
1G-98 ACCCAGACTGTGACAGAGCAAACCCGGAGGGCTCGTAAAAGATTGTC [48]
262-74 ACCCAGACTGTGACAGAGCAAACCCGGAGGGCTCGTAAAAGATTGTC [48]
Zmeinogorsk-1 ACCCAGACTGTGACAGAGCAAACCCGGAGGGCTCGTAAAAGATTGTC [48]
Zmeinogorsk-5 ACCCAGACTGTGACAGAGCAAACCCGGAGGGCTCGTAAAAGATTGTC [48]
Zmeinogorsk-9 ACCCAGACTGTGACAGAGCAAACCCGGAGGGCTCGTAAAAGATTGTC [48]
Kubinova_ (KJ922512) ACC CAG ACT GTG AC- --- CAA TAC T-- --- --- TCG TGA GA- --- --- [48]
Petracova_ (KJ922513) ACC CAT ACT GTG ACA GAG CAA AAC CCG GAG GGC TCG TAA AAA ATT GTC [48]
Skrivanek_ (KJ922514) ACC CAG ACT GTG ACA GAG CAA AAC CCG GAG GGC TCG TAA AAG ATT GTC [48]
Tobрман_ (KJ922515) ACC CAT ACT GTG ACA GAG CAA AAC CCG GAG GGC TCG CAA AAA ATT GTC [48]
Vlasaty_ (KJ922516) ACC CAG ACT GTG ACA GAG CAA AAC CCG GAG GGC TCG TAA AAG ATT GTC [48]

```

```

Neudoerfl_ (U27495) CGG AAC CAA AAG AAA AGC AAG CAA CTC ACA GAG ATA GAG CTC GGA CTG [96]
Hypr_ (U39292) CGG AAC CAA AAG AAA AGC AAG --- --- --- --- --- --- --- --- [96]
118-71 CGG AAC CAA AAG GAA AGC AAG --- --- --- --- --- --- --- --- [96]
126-71 CGG AAC CAA AAG GAA AGC AAG --- --- --- --- --- --- --- --- [96]
163-74 CGG AAC CAA AAG GAA AGC AAG --- --- --- --- --- --- --- --- [96]
1G-98 CGG AAC CAA AAG GAA AGC AAG --- --- --- --- --- --- --- --- [96]
262-74 CGG AAC CAA AAG GAA AGC AAG --- --- --- --- --- --- --- --- [96]
Zmeinogorsk-1 CGG AAC CAA AAG GAA AGC AAG --- --- --- --- --- --- --- --- [96]
Zmeinogorsk-5 CGG AAC CAA AAG GAA AGC AAG --- --- --- --- --- --- --- --- [96]
Zmeinogorsk-9 CGG AAC CAA AAG GAA AGC AAG --- --- --- --- --- --- --- --- [96]
Kubinova_ (KJ922512) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [96]
Petracova_ (KJ922513) CGG AA- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [96]
Skrivanek_ (KJ922514) CGG AAC CAA AAG AAA AGC AAA A-- --- --- --- --- --- --- --- [96]
Tobрман_ (KJ922515) CGG AA- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [96]
Vlasaty_ (KJ922516) CGG AAC CAA AAG AAA AGC AAG --- --- --- --- --- --- --- --- [96]

```

```

Neudoerfl_ (U27495) GAG AGC TCT TTA AAC AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA [144]
Hypr_ (U39292) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
118-71 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
126-71 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
163-74 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
1G-98 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
262-74 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
Zmeinogorsk-1 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
Zmeinogorsk-5 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
Zmeinogorsk-9 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
Kubinova_ (KJ922512) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
Petracova_ (KJ922513) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
Skrivanek_ (KJ922514) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
Tobрман_ (KJ922515) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]
Vlasaty_ (KJ922516) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [144]

```

```

Neudoerfl_ (U27495) AAA AAA AAA AAA AAA AGC CAG AAT TGA GCT GAA CCT GGA GAG CTC ATT [192]
Hypr_ (U39292) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
118-71 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
126-71 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
163-74 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
1G-98 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
262-74 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
Zmeinogorsk-1 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
Zmeinogorsk-5 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
Zmeinogorsk-9 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
Kubinova_ (KJ922512) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
Petracova_ (KJ922513) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
Skrivanek_ (KJ922514) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
Tobрман_ (KJ922515) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]
Vlasaty_ (KJ922516) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [192]

```

```

Neudoerfl_ (U27495) AAA TAC AGT CCA GAC GAA ACA AAA CAT GAC AAA GCA AAG AGG CTG AGC [240]
Hypr_ (U39292) --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [240]
118-71 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [240]
126-71 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [240]
163-74 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [240]
1G-98 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [240]
262-74 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- [240]

```

Zmeinogorsk-1 [240]
Zmeinogorsk-5 [240]
Zmeinogorsk-9 [240]
Kubinoва_(KJ922512) [240]
Petracova_(KJ922513) [240]
Skrivanek_(KJ922514) [240]
Tobzman_(KJ922515) [240]
Vlasaty_(KJ922516) [240]

Neudoerfl_ (U27495) TAAAAGTCCCACTACGGGACTGCTTCATAGCGGTTTGTGGGGGAGG [288]
Hypr_ (U39292) [288]
118-71 [288]
126-71 [288]
163-74 [288]
1G-98 [288]
262-74 [288]
Zmeinogorsk-1 [288]
Zmeinogorsk-5 [288]
Zmeinogorsk-9 [288]
Kubinoва_(KJ922512) [288]
Petracova_(KJ922513) TAA AAG TTC CCA CTA CGG GAC TGC TTC ACA GCG GTT TGT GGG GGG AGG [288]
Skrivanek_(KJ922514) TAA AAG TTC CCA CCT CGG GAC TGC TTC ATA GCG GTT TGT GGG GGG AGG [288]
Tobzman_(KJ922515) TAA AAG TTC CCA CTA CGG GAC TGC TTC ACA GCG GTT TGT GGG GGG AGG [288]
Vlasaty_(KJ922516) [288]

Neudoerfl_ (U27495) CTA GGA GGC GAA GCC ACA GAT CAT GGA ATG ATG CGG CAG CGC GCG AGA [336]
Hypr_ (U39292) ---CA ACT CAC AGA GTG--- [336]
118-71 [336]
126-71 [336]
163-74 [336]
1G-98 [336]
262-74 [336]
Zmeinogorsk-1 [336]
Zmeinogorsk-5 [336]
Zmeinogorsk-9 [336]
Kubinoва_(KJ922512) [336]
Petracova_(KJ922513) CTA GGA GGC GAA GCC ACA GAT CAT GGA ATG ATG CGG CAG CGC GCG AGA [336]
Skrivanek_(KJ922514) CTA GGA GGC GAA GCC ACA GAT CAT GGA ATG ATG CGG CAG CGC GCG AGA [336]
Tobzman_(KJ922515) CTA GGA GGC GAA GCC ACA GAT CAT GGA ATG ATG CGG CAG CGC GCG AGA [336]
Vlasaty_(KJ922516) [336]

Neudoerfl_ (U27495) GCG ACG GGG AAG TGG TCG CAC CCG ACG CAC CAT CCA TGA AGC AAT ACT [384]
Hypr_ (U39292) [384]
118-71 [384]
126-71 [384]
163-74 [384]
1G-98 [384]
262-74 [384]
Zmeinogorsk-1 [384]
Zmeinogorsk-5 [384]
Zmeinogorsk-9 [384]
Kubinoва_(KJ922512) [384]
Petracova_(KJ922513) GCG ACG GGG AAG TGG TCG CAC CCG ACG CAC CAT CCA TGA AGC AAT ACT [384]
Skrivanek_(KJ922514) GCG ACG GGG AAG TGG TCG TAC CCG ACG CAC CAT CCA TGA AGC AAT ACT [384]
Tobzman_(KJ922515) GCG ACG GGG AAG TGG TCG CAC CCG ACG CAC CAT CCA TGA AGC AAT ACT [384]
Vlasaty_(KJ922516) [384]

Neudoerfl_ (U27495) TCG TGA GAC CCC CCC TGA CCA GCA AAG GGG GCA GAC CGG TCA GGG GTG [432]
Hypr_ (U39292) --- TGA GAC CCC CC- TGA CCA GCA AAG GGG -CA GAT CGG TCA GGG GTG [432]
118-71 [432]
126-71 [432]
163-74 [432]
1G-98 [432]
262-74 [432]
Zmeinogorsk-1 [432]
Zmeinogorsk-5 [432]
Zmeinogorsk-9 [432]
Kubinoва_(KJ922512) [432]
Petracova_(KJ922513) TCG TGA GAC TCC CC- TGA CCG GCA AAG GGG GCA AAC CGG TCG GGG GTG [432]
Skrivanek_(KJ922514) TCG TGA GAC TCC CC- TGA CCG GCA AAG GGG GCA AAC CGG TCG GGG GTG [432]
Tobzman_(KJ922515) TCG TGA GAC TCC CC- TGA CCG GCA AAG GGG GCA AAC CGG TCG GGG GTG [432]
Vlasaty_(KJ922516) --- CAA AAA CCC CCC TGA CCA GCA AAG GGG GCA AAC CGG TCA GGG GTG [432]

Neudoerfl_ (U27495) AGG AAT GCC CCC AGA GTG CAT TAC GGC AGC ACG CCA GTG AGA GTG GCG [480]
Hypr_ (U39292) AGG GAT GCC CCC AGA GTG CAT TAC GGC AGC ACG CCA GTG AGA GTG GCG [480]
118-71 [480]
126-71 [480]
163-74 [480]
1G-98 [480]
262-74 [480]

Zmeinogorsk-1 AGG GAT GCC CCC AGA GTG CAT TAC GGC AGC ACG CCA GTG AGA GTG GCG [480]
 Zmeinogorsk-5 AGG GAT GCC CCC AGA GTG CAT TAC GGC AGC ACG CCA GTG AGA GTG GCG [480]
 Zmeinogorsk-9 AGG GAT GCC CCC AGA GTG CAT TAC GGC AGC ACG CCA GTG AGA GTG GCG [480]
 Kubinova_(KJ922512) AGG GAT GCC CCC AGA GTG TAT TAC GGC AGC ACG CCA GTG AGA GTG GCG [480]
 Petracova_(KJ922513) AGG GAT GCC CCC AGA GTG CAT TAC GGC AGC ACG CCA GTG AGA GTG GCG [480]
 Skrivanek_(KJ922514) AGG GAT GCC CCC AGA GTG CAT TGC GGC AGC ACG CCA GTG AGA GTG GCG [480]
 Tobrman_(KJ922515) AGG GAT GCC CCC AGA GTG CAT TAC GGC AGC ACG CCA GTG AGA GTG GCG [480]
 Vlasaty_(KJ922516) AGG GAT GCC CCC AGA GTG CAT TAC GGC AGC ACG CCA GTG AGA GTG GCG [480]

Neudoerfl_(U27495) **ACGGGAAAATGGTCGATCCCGACGTAGGGCACTCTGAAAATTTGTG** [528]
Hypr_(U39292) **ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAC TTT GTG** [528]
 118-71 ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TTT GTG [528]
 126-71 ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TTT GTG [528]
 163-74 ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TTT GTG [528]
 1G-98 ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TTT GTG [528]
 262-74 ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TTT GTG [528]
 Zmeinogorsk-1 ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TTT GTG [528]
 Zmeinogorsk-5 ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TTT GTG [528]
 Zmeinogorsk-9 ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TTT GTG [528]
 Kubinova_(KJ922512) ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TCT GTG [528]
 Petracova_(KJ922513) ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TTT GTG [528]
 Skrivanek_(KJ922514) ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TTT GTG [528]
 Tobrman_(KJ922515) ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TCT GTG [528]
 Vlasaty_(KJ922516) ACG GGA AAA TGG TCG ATC CCG ACG TAG GGC ACT CTG AAA AAT TTT GTG [528]

Neudoerfl_(U27495) **AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A** [576]
Hypr_(U39292) **AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA AGG G-A** [576]
 118-71 AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A [576]
 126-71 AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A [576]
 163-74 AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A [576]
 1G-98 AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A [576]
 262-74 AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A [576]
 Zmeinogorsk-1 AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A [576]
 Zmeinogorsk-5 AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A [576]
 Zmeinogorsk-9 AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A [576]
 Kubinova_(KJ922512) AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A [576]
 Petracova_(KJ922513) AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A [576]
 Skrivanek_(KJ922514) AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A [576]
 Tobrman_(KJ922515) AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG G-A [576]
 Vlasaty_(KJ922516) AGA CCC CCT GCA TCA TGA TAA GGC CGA ACA TGG TGC ATG AAA GGG GGA [576]

Neudoerfl_(U27495) **GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG** [624]
Hypr_(U39292) **GGC CCC CGG AAG TAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG** [624]
 118-71 GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]
 126-71 GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]
 163-74 GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]
 1G-98 GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]
 262-74 GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]
 Zmeinogorsk-1 GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]
 Zmeinogorsk-5 GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]
 Zmeinogorsk-9 GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]
 Kubinova_(KJ922512) GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]
 Petracova_(KJ922513) GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]
 Skrivanek_(KJ922514) GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]
 Tobrman_(KJ922515) GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]
 Vlasaty_(KJ922516) GGC CCC CGG AAG CAC GCT TCC GGG AGG AGG GAA GAG AGA AAT TGG CAG [624]

Neudoerfl_(U27495) **CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG** [672]
Hypr_(U39292) **CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG** [672]
 118-71 CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]
 126-71 CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]
 163-74 CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]
 1G-98 CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]
 262-74 CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]
 Zmeinogorsk-1 CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]
 Zmeinogorsk-5 CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]
 Zmeinogorsk-9 CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]
 Kubinova_(KJ922512) CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]
 Petracova_(KJ922513) CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]
 Skrivanek_(KJ922514) CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]
 Tobrman_(KJ922515) CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]
 Vlasaty_(KJ922516) CTC TCT TCA GGA TTT TTC CTC CTC CTA TAC AAA ATT CCC CCT CGG TAG [672]

Neudoerfl_(U27495) **AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG** [720]
Hypr_(U39292) **AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG** [720]
 118-71 AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]
 126-71 AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]
 163-74 AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]
 1G-98 AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]

262-74	AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]
Zmeinogorsk-1	AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]
Zmeinogorsk-5	AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]
Zmeinogorsk-9	AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]
Kubinova_(KJ922512)	AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]
Petracova_(KJ922513)	AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]
Skrivanek_(KJ922514)	AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGG GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]
Tobzman_(KJ922515)	AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]
Vlasaty_(KJ922516)	AGG GGG GGC GGT TCT TGT TCT CCC TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CAG [720]
Neudoerfl_(U27495)	GTA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GTG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
Hypr_(U39292)	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GTG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
118-71	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GTG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
126-71	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GTG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
163-74	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GTG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
1G-98	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GTG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
262-74	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GTG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
Zmeinogorsk-1	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GCG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
Zmeinogorsk-5	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GCG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
Zmeinogorsk-9	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GCG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
Kubinova_(KJ922512)	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GTG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
Petracova_(KJ922513)	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GTG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
Skrivanek_(KJ922514)	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GTG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
Tobzman_(KJ922515)	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GTG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]
Vlasaty_(KJ922516)	ATA GTC TGA CAA GGA GGT GAT GTG TGA CTC GGA AAA ACA CCC GCT [765]

Рисунок 5.1 - Сравнение 3'-некодирующей области генома у штаммов ВКЭ-ЕС из Восточной и Западной Сибири и штаммов из Европы (*Hypr* и *Neudoerfl*).

Примечание. Делеции показаны пунктиром, у штаммов из Сибири они заключены в цветные прямоугольники.

Механизм возникновения таких делеций в 3'-некодирующей области генома ВКЭ на сегодняшний день не ясен, их роль как факторов вирулентности и значение для эволюции вирусных популяций остаются не до конца изученными (Belikov S., 2014) и требуют дальнейших исследований.

Таким образом, в ходе проведенного нами исследования было отмечено, что популяция ВКЭ-ЕС на территории Сибири характеризуется гетерогенностью фенотипических свойств. Установлено, что штаммы ВКЭ-ЕС из Западной и Восточной Сибири обладают высокой нейровирулентностью, но часть из них, аналогично штаммам из Европы, проявляют низкую инвазивность. На основании изученных нами генетических маркеров, связанных с особенностями внутриклеточной репродукции, нами сделано предположение, что популяция ВКЭ-ЕС из Сибири по всей видимости обладает хорошими адаптивными способностями и, следовательно, может легко приспособливаться к циркуляции в составе

разнообразных биоценозов на территории различных ландшафтно-географических зон.

Было установлено, что все исследуемые штаммы из Сибири имеют делецию в варибельной части 3'-некодирующей области генома сравнимую с таковой по длине у штамма *Hupr*. Корреляционной связи между наличием делеции и вирулентностью штамма не установлено. Механизм возникновения делеций в 3'-некодирующей области генома, их роль как факторов вирулентности и их значение для эволюции вирусных популяций остаются неясными (Belikov S., 2014) и требуют дальнейших исследований.

ГЛАВА 6

ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЙОНОВ ИЗОЛЯЦИИ ШТАММОВ ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Как уже упоминалось нами ранее вопросы экологии ВКЭ-ЕС, на территории Европы, достаточно хорошо освещены в научной литературе. Информация же об экосистемах, в которых осуществляется циркуляция вируса данного субтипа на территории Сибири, практически отсутствует. Для выявления особенностей экологии ВКЭ-ЕС, циркулирующего за пределами основного европейского ареала, нами дана эколого-географическая характеристика районов изоляции штаммов данного субтипа на территории Сибирского региона.

Западная Сибирь

В наше исследование были взяты штаммы ВКЭ-ЕС *Змеиногорск-1*, *Змеиногорск-3*, *Змеиногорск-5*, *Змеиногорск-7*, *Змеиногорск-9*, которые были изолированы на территории Змеиногорского района Алтайского края.

Этот район характеризуется разнообразием ландшафтов, что обеспечивает обитание на его территории нескольких видов иксодовых клещей. Однако все пять исследуемых нами штаммов ВКЭ-ЕС были изолированы от клещей *I. persulcatus*.

В связи с тем, что в нашей работе было исследовано всего пять штаммов из Западной Сибири, нами дополнительно проведен анализ эколого-географических особенностей других районов этого региона, где выявлена циркуляция ВКЭ-ЕС. Информация об изолированных штаммах была почерпнута нами из научной литературы.

Так, в степных ландшафтах Угловского района из клещей *D. marginatus* был выделен штамм *12720* ВКЭ-ЕС (Оберт А.С., 2015; Якименко В.В., 2019).

В 1990-1991 гг. и в 2010 г. штаммы ВКЭ-ЕС были изолированы из материала, собранного в Кош-Агачском районе Республики Алтай, в том числе в безиксодовых очагах среднегорий на высотах более 2000 м н.у.м.

(Якименко В.В., 2015). Штаммы ВКЭ-ЕС на территории Кош-Агачского района были выделены преимущественно от полевков (красно-серой, красной, скальной, большеухой, узкочерепной, полевки-экономки). Один штамм был изолирован от орибатид, снятых с Алтайской пищухи. Еще один штамм ВКЭ-ЕС на территории данного района был выделен от горного конька (*Anthus spinoletta*) (Якименко В.В., 2015).

В 2007 г. штаммы ВКЭ-ЕС были изолированы из полевого материала, собранного на территории Майминского района Республики Алтай (коды доступа в GenBank и EMBL – *Altay-103* JQ687275 и *Altay-84.2* HM120875) (Якименко В.В., 2019). Оба штамма были выделены от таежных клещей. Также в научной литературе мы обнаружили данные, свидетельствующие об изоляции двух штаммов ВКЭ-ЕС от клещей *I. pavlovskyi* на территории Шебалинского района Республики Алтай в 2014 г. (Ткачев С.Е., 2017). ВКЭ-ЕС также обнаруживался на Правобережном Приобье, в том числе на Салаире в пределах Тогучинского района Новосибирской области (2011 г.) (Якименко В.В., 2019). На территории данного района штаммы ВКЭ-ЕС выделялись от клещей *I. persulcatus* (Ткачев С.Е., 2011; Морозова О.В., 2014; Якименко В.В., 2019).

Исследование штаммов ВКЭ, изолированных в западных предгорьях Салаира (равнинная часть Тогучинского района) в 60-е гг. XX века из иксодовых клещей, из крови и ликвора больных КЭ также подтвердило присутствие ВКЭ-ЕС в данном регионе (Якименко В.В., 2019).

В равнинной части Западной Сибири штаммы ВКЭ-ЕС были выделены из материала, собранного на территории Омской области (Знаменский, Тарский и Тюкалинский районы). Один штамм ВКЭ-ЕС был изолирован от таежного клеща, снятого с растительности на флаг на территории Знаменского района (Якименко В.В., 2019). В 1990 г. из клеща *I. trianguliceps*, отловленного на территории Тарского района, был выделен штамм ВКЭ-ЕС (Якименко В.В., 2019). На территории Тюкалинского района в 2007 г. штаммы ВКЭ-ЕС были изолированы от таежного и лугового

клещей (Якименко В.В., 2019). ВКЭ-ЕС также циркулирует на территории Тюменской области, что подтверждается выделением штамма данного субтипа из органов узкочерепной полевки.

Для обобщения информации, полученной в ходе характеристики районов изоляции штаммов ВКЭ-ЕС, нами составлена карта-схема, характеризующая особенности рельефа и ландшафта территории Западной Сибири с нанесением на нее мест изоляции штаммов (Рис. 6.1). А также дополнительно составлена таблица, в которую кроме информации о типах рельефа и ландшафта включена характеристика климата районов изоляции штаммов ВКЭ-ЕС на территории Западной Сибири.



Рисунок 6.1 - Карта-схема распространения ВКЭ-ЕС на территории Западной Сибири.

Таблица 6.1 - Эколого-географическая характеристика районов изоляции штаммов ВКЭ-ЕС на территории Западной Сибири

Район изоляции штамма ВКЭ-ЕС	Высота над уровнем моря (м)	Климат	Тип рельефа	Тип ландшафта
Западная Сибирь				
<i>Алтайский край</i>				
<i>Змеиногорский</i>	276-489	умеренно континентальный	равнинный, низкогорный	степной, лесной, горно-таежный
<i>Угловский</i>	189	резко-континентальный, засушливый	равнинный	степной
<i>Республика Алтай</i>				
<i>Кош-Агачский</i>	1740-2390	резко-континентальный, сухой	средне- и высокогорный	степной
<i>Шебалинский</i>	460-1200	умеренно континентальный	низкогорный	лесной, степной
<i>Майминский</i>	284-640	умеренно континентальный, увлажненный	низкогорный	лесной, степной
<i>Новосибирская область</i>				
<i>Тогучинский</i>	131-149	резко-континентальный, увлажненный	равнинный, предгорный	лесостепной
<i>Омская область</i>				
<i>Знаменский</i>	65-143	умеренно континентальный	равнина	таежный, лесной
<i>Тарский</i>	41-150	умеренно континентальный	равнина	таежный, лесной
<i>Тюкалинский</i>	102-118	резко-континентальный	равнина	лесостепной, степной

Восточная Сибирь

В рамках данной работы нами было исследовано десять штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных на территории Восточной Сибири. Восемь из которых были выделены из материала, собранного в Эхирит-Булагатском районе, один – в Иркутском районе Иркутской области, еще один – на территории Бичурского района Республики Бурятия (Табл. 6.2).

Таблица 6.2 - Координаты мест изоляции штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа на территории Восточной Сибири из коллекции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ

Место изоляции штамма	Координаты	ШтаммыВКЭ-ЕС
Иркутская область		
<i>Эхирит-Булагатский район</i>		
с. Олой	52°54' с. ш. 105°02' в. д.	126-71, 134-71, 118-71, 157-74, 163-74, 262-74, 272-75
с. Красный Яр	52°32' с. ш. 105°02' в. д.	898-84
<i>Иркутский район</i>		
17 км Байкальского тракта	52°22' с.ш. 104°49' в.д.	1G-98
Республика Бурятия		
<i>Бичурский район</i>		
п. Бичура	50°35' с. ш. 107°36' в. д.	244-83

Эхирит-Булагатский район расположен на юге Иркутской области, занимает юго-восточную часть Усть-Ордынского Бурятского округа.

Ландшафт определяется Иркутско-Балаганской лесостепью, в пределах которой он находится. Эхирит-Булагатский район представляет значительный научный интерес благодаря уникальности его биоценотической структуры. Для этого района характерно сложное сочетание таежных ландшафтов с участками перехода от лесостепных к степным ландшафтам, приуроченным к местам, нарушенным хозяйственной деятельностью человека (Данчинова Г.А., 1988; Верховина М.М., 2002). Многообразие ландшафтных формаций обеспечивает большую пестроту обитающей здесь флоры и фауны. Для Эхирит-Булагатского района характерно мозаичное сочетание лесов, степей, лугов и болот. В долинах рек обычны заболоченные ерниковые заросли. Значительная часть территории района занята лесостепью. Ее островные леса образованы сосной обыкновенной с примесью лиственницы, березы и осины. Между островами лесов распространены злаковые степи. На территории района встречаются

иксодовые клещи четырех видов – *I. persulcatus*, *D. silvarum*, *D. nuttalli* и *H. concinna*.

Штаммы ВКЭ-ЕС на территории данного района были выделены в двух ключевых участках – окрестностях поселка Олой и Красный Яр.

Поселок Олой, находится в центральной части Эхирит-Булагатского района, в лугово-лесостепной местности с обширными сельскохозяйственными угодьями, где значительные площади лесов сведены под пашню, а на остальной территории проводится выпас скота. Штаммы 126-71, 134-71, 118-71, 157-74, 163-74, 262-74 и 272-75 были выделены из полевого материала, собранного в этом ключевом участке.

Участок «Красный Яр» расположен в предгорных лесах Онотской возвышенности (тайга равнин и плато), значительно нарушенных антропогенной деятельностью. Характеризуется наличием смешанных сосново-лиственных лесов с небольшими участками коренного леса и лесовозобновлением по вырубкам. Из мозга красной полевки, отловленной в пределах данного участка, был изолирован штамм 898-84 ВКЭ-ЕС.

Иркутский район расположен на юге Иркутской области. Он находится на стыке Сибирской платформы и Байкальской складчатости. Основным тектоническим объектом территории Иркутского района является структура Сибирской платформы. Это объясняет разнообразный рельеф и ландшафт района.

В наше исследование был взят штамм 1G-98 ВКЭ-ЕС, который был выделен от больного КЭ человека, который пострадал от укуса инфицированного таежного клеща на территории Иркутского района (17 км Байкальского тракта). Кроме того в литературе имеется информация об изоляции четырех штаммов ВКЭ данного субтипа из полевого материала, собранного на 43 и 47 км Байкальского тракта. Эти участки также относятся к территории Иркутского района (Adelshin R.V., 2015). Штамм *IrkutskBR_99-08* был выделен в 2008 г. от таежного клеща, собранного на 47 км Байкальского тракта. Штаммы *IrkutskBR_1456-09* и *IrkutskBR_1434-09* были

изолированы в 2009 г. от клещей *I. persulcatus*, отловленных на 43 км Байкальского тракта, штамм *Sorex 18-10* был изолирован от буроzubки в 2010 г. Последовательности геномов этих штаммов были использованы нами при анализе особенностей генетической характеристики штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных на территории Сибири. В связи с этим мы сочли необходимым включить описание мест изоляции данных штаммов в наше исследование.

Штаммы ВКЭ-ЕС на территории данного района были изолированы в биотопах, дислоцированных вдоль Байкальского тракта. Байкальский тракт является частью федеральной автомобильной трассы М-53 России, связывающей город Иркутск и посёлок городского типа Листвянка на Байкале (у истока реки Ангары). Вдоль неё есть лесополосы, посаженные с целью укрепления насыпи и ветрозащиты. Помимо трассы с юго-востока на северо-запад протянута ЛЭП (линия электропередач) на бетонных основах. На 15, 16, 17, 21 и 28 километрах к тракту примыкают дачные массивы. Большая часть пути проходит по горам среди густого смешанного леса из сосны, березы, осины и подлеска из кустарника. Разные участки вдоль этой магистрали отличаются друг от друга по удаленности от областного центра, антропогенному воздействию (в т.ч. посещаемости их населением) и составу растительных сообществ. Ближний к городу участок, подвергшийся в большей степени антропогенному прессу, находится на ранних этапах сукцессионного процесса (преобладание средне- и высоковозрастных березняков). На 43 и 47 км шире представлены коренные таежные биотопы. На территории Байкальского тракта отмечается очень высокая численность клещей *I. persulcatus*, зафиксированы единичные случаи находок клещей рода *Dermacentor*.

В нашей коллекции также имеется штамм 244-83 ВКЭ-ЕС, который был выделен в 1983 г. из клещей *I. persulcatus*, собранных на территории **Бичурского района** Республики Бурятия. Территория этого района расположена на юго-востоке Республики Бурятия. Он простирается по

Бичурской котловине и примыкающим к ней Окино-Ключевской возвышенности и долине Хилка, пересеченной Бургутуйским хребтом. С юга Бичурская котловина ограничена отрогами Малханского хребта (Бичурской грядой), с запада – долиной реки Чикой, а с севера район отделен Заганским хребтом. Земли Бичурского района расположены на территории, характеризующейся значительной расчлененностью рельефа и приподнятостью над уровнем моря. В них имеются степные, лесостепные и луговые участки. Крупной является Хилокская межгорная впадина. Для Бичурского района характерен резко континентальный климат с большими годовыми и суточными колебаниями температур воздуха и с неравномерным распределением атмосферных осадков по сезонам года. Расположение района исследования на границе двух различных природных зон – горно-таежной и степной обуславливает разнообразие ландшафтов. Горная тайга представлена лиственничными лесами с густым подлеском и мощной моховой подстилкой, а также кедровыми и пихто-кедровыми лесами. Лесостепная зона имеет сосновые леса и засухоустойчивые кустарники. Вместе с тем преобладающая часть лесостепи и степи распахана или является кормовыми угодьями (Давыдова Т.В., 2014).

Краткая эколого-географическая характеристика мест изоляции штаммов ВКЭ-ЕС на территории Восточной Сибири приведена в таблице 6.3.

Таблица 6.3 - Эколого-географическая характеристика мест изоляции штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа на территории Восточной Сибири

Место изоляции штамма	Климат	Высота над уровнем моря (м)	Тип рельефа	Тип ландшафта
Иркутская область				
Эхирит-Булагатский район				
<i>с. Олой</i>	резко континентальный	613	равнина, плато	Островных степей и лесостепей с разнотравно-злаковыми луговыми степями, переходящими в сосновые леса с примесью

				березы и осины по травяно-брусничному покрову с рододендромом даурским (Верхозина М.М., 2015).
<i>с. Красный Яр</i>		690	плато	Тайга равнин и плато с долинными лиственничными бруснично-зеленомошными и вторичными осиново-березовыми лесами (Верхозина М.М., 2015).
<i>Иркутский район</i>				
<i>Байкальский тракт 17 км</i>	резко континентальный	578	равнина, плато	Подтаежных лесостепей с разнотравно-злаковыми луговыми степями, переходящими в сосновые леса с примесью березы и осины по травяно-брусничному покрову с рододендромом даурским (Верхозина М.М., 2015).
<i>Байкальский тракт, 43 км</i>		498		
<i>Байкальский тракт, 47 км</i>		477		
Республика Бурятия				
<i>Бичурский район</i>				
<i>п. Бичура</i>	резко континентальный	653 м	плоскогорье	Таежные среднегорья с элементами лесостепи с вторичными осиновыми и березовыми лесами (Верхозина М.М., 2015).

Таким образом, в результате анализа эколого-географической характеристики районов изоляции штаммов нами получены свидетельства того, что на территории Западной и Восточной Сибири ВКЭ-ЕС циркулирует в условиях экосистем, отличающихся разнообразием рельефа, ландшафтов, климата, флоры и фауны. Штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири были изолированы на территориях с различным типом рельефа – от равнин (от 41 м н.у.м.) до среднегорья (выше 2200 м н.у.м.). Районы изоляции штаммов отличаются разнообразием ландшафтов (от степного до горно-таежного) и обитающей здесь флоры и фауны. Климат районов, в которых выявлена циркуляция

ВКЭ-ЕС достаточно суров, варьирует от умеренно- до резко континентального, от засушливого до увлажненного.

С целью выявления спектра переносчиков и резервуарных хозяев, способных поддерживать циркуляцию ВКЭ-ЕС на территории Сибири, нами проведен анализ источников изоляции штаммов ВКЭ-ЕС (Табл. 6.4).

Из 23 штаммов ВКЭ-ЕС 19 были изолированы от таежных клещей, что позволяет нам высказать предположение, что основным переносчиком и резервуарным хозяином данного субтипа вируса на территории Сибири является клещ *I. persulcatus*. ВКЭ-ЕС на территории Западно-Сибирского региона обнаружен и в других видах клещей рода *Ixodes*: *I. trianguliceps* и *I. pavlovskyi*, а также в клещах рода *Dermacentor*: *D. marginatus* и *D. reticulatus*. Возможное векторное участие клещей *D. marginatus* в переносе ВКЭ-ЕС на территории Центральной Азии также подтверждается изоляцией двух штаммов (12929, 12967) на территории Карагандинского района Республики Казахстан в 2001 г. (Якименко В.В., 2019).

Ранее считалось, что основным переносчиком ВКЭ-ЕС является клещ *I. ricinus*, а таежный клещ обладает векторной способностью только в отношении дальневосточного и сибирского субтипов вируса. Наши исследования опровергают эти данные и свидетельствуют о том, что на территории Сибири эту роль может успешно выполнять клещ *I. persulcatus*.

При этом роль *I. ricinus* как основного переносчика ВКЭ-ЕС на территории Европы подтверждается анализом данных об источниках изоляции штаммов из этой части света.

Таблица 6.4 - Виды клещей, из которых были изолированы штаммы ВКЭ-ЕС на территории Сибири

№	Вид клеща	Год изоляции	Район изоляции	Штамм
Западная Сибирь				
1.	<i>I. persulcatus</i>	1986	Алтайский край, Змеиногорский район	<i>Змеиногоorsk-1</i>
2.	<i>I. persulcatus</i>	1986	-//-	<i>Змеиногоorsk-3</i>
3.	<i>I. persulcatus</i>	1986	-//-	<i>Змеиногоorsk-5</i>
4.	<i>I. persulcatus</i>	1986	-//-	<i>Змеиногоorsk-7</i>

5.	<i>I. persulcatus</i>	1986	-//-	Змеиногорск-9
6.	<i>D. marginatus</i>	2012	Алтайский край, Угловский район	12720*
7.	<i>I. persulcatus</i>	2011	Новосибирская область, Тогучинский район	-*
8.	<i>I. persulcatus</i>	2007	Омская область, Знаменский район	-*
9.	<i>I. trianguliceps</i>	1990	Омская область, Тарский район	-*
10.	<i>I. persulcatus</i>	2007	-//-	-*
11.	<i>D. reticulatus</i>	2007	Омская область, Тюкалинский район	-*
12.	<i>I. persulcatus</i>	2007	Республика Алтай, Майминский район	Altay-103*
13.	<i>I. persulcatus</i>	2007	-//-	Altay-84.2*
14.	<i>I. pavlovskiy</i>	2014	Республики Алтай. Шебалинский район	Altai RUS/Alt14-1564*
15.	<i>I. pavlovskiy</i>	2014	Республики Алтай, Шебалинский район	Altai RUS/Alt14-1603*
Восточная Сибирь				
16.	<i>I. persulcatus</i>	1971	Иркутская область, Эхирит-Булагатский район	126-71
17.	<i>I. persulcatus</i>	1974	-//-	163-74
18.	<i>I. persulcatus</i>	1974	-//-	157-74
19.	<i>I. persulcatus</i>	1974	-//-	262-74
20.	<i>I. persulcatus</i>	2008	Иркутская область, Иркутский район	IrkutskBR_99-08*
21.	<i>I. persulcatus</i>	2009	-//-	IrkutskBR_1456-09*
22.	<i>I. persulcatus</i>	2009	-//-	IrkutskBR_1434-09*
23.	<i>I. persulcatus</i>	1983	Республика Бурятия, Бичурский район	244-83

Примечание: *отмечены штаммы, информация об источниках изоляции которых взята из источников литературы.

Так, из 41 штамма ВКЭ-ЕС, полные геномы которых были взяты нами в исследование, 40 были изолированы от клещей *I. ricinus*, и только один штамм КЕМ 127 (MG210947) из Венгрии был выделен от клеща *H. concinna*.

Наши данные и анализ источников литературы свидетельствует о том, что циркуляция ВКЭ-ЕС на территории Сибири поддерживается несколькими видами грызунов, преимущественно полевками (красно-серая, красная, плоскочерепная, большеухая, узкочерепная, полевка-экономка), а также сусликами (суслик длиннохвостый), насекомоядными (бурозубка),

зайцеобразными (алтайская пищуха) и некоторыми видами наземно гнездящихся птиц (Табл. 6.5).

Кроме того, ВКЭ-ЕС на территории Западной Сибири был изолирован от гамазовых клещей и орибатид, снятых с алтайской пищухи (Табл. 6.5). Роль гематофагов в поддержании циркуляции ВКЭ-ЕС не ясна и нуждается в уточнении.

В электронной базе данных GenBank имеются нуклеотидные последовательности штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных на территории Европы от рыжей полевки (*Myodes glareolus*) (KC835597), лесной мыши (*Apodemus sylvaticus*), обыкновенной белки (*Sciurus vulgaris*), желтогорлой мыши (*Apodemus flavicollis*) (KF151173). Achazi K. и соавт. сообщали о детекции ВКЭ от шести видов грызунов: полевая мышь (*Apodemus agrarius*), желтогорлая мышь (*A. flavicollis*), лесная мышь (*A. sylvaticus*), темная полевка (*Microtus agrestis*), обыкновенная полевка (*M. arvalis*), и рыжая полевка (*Myodes glareolus*) (Achazi K., 2011). На территории Южной Кореи штаммы ВКЭ-ЕС были изолированы от полевой мыши (*Apodemus agrarius*) (Kim S.Y., 2008; Yun S.M., 2009).

Таблица 6.5 - Виды мелких млекопитающих и птиц, из которых изолированы штаммы ВКЭ-ЕС на территории Сибири

№	Вид клеща	Год изоляции	Район изоляции	Штамм
1.	красно-серая полевка (<i>Myodes rufocanus</i>)	2010	Республика Алтай Кош-Агачский район,	12691*
2.	красно-серая полевка	2010	-//-	12693*
3.	красно-серая полевка	2010	-//-	12695*
4.	плоскочерепная полевка (<i>Alticola strelzovi</i>)	2010	-//-	12984*
5.	красно-серая полевка	2010	-//-	12988*
6.	красная полевка (<i>Myodes rutilus</i>)	2010	-//-	12682*
7.	плоскочерепная полевка	1990	-//-	12980*
8.	большееухая полевка (<i>Alticola macrotis</i>)	1990	-//-	5970*
9.	Алтайская пищуха <i>Oribateifam. ge. sp.</i> (<i>Ochotona alpina</i>)	1990	-//-	5973*
10.	большееухая полевка	1990	-//-	5997*

11.	узкочерепная полевка (<i>Microtus gregalis</i>)	1990	-//-	5977*
12.	узкочерепная полевка	1991	-//-	5284*
13.	горный конек (<i>Anthus spinoletta</i>)	1991	-//-	6675*
14.	плоскочерепная полевка	1991	-//-	5983*
15.	полевка-экономка (<i>Microtus oeconomus</i>)	1991	-//-	6447*
16.	узкочерепная полевка	2006	Тюменская область	-*
17.	суслик длиннохвостый(<i>Spermophilus undulatus</i>)	1971	Иркутская область Эхирит-Булагатский район	118-71
18.	суслик длиннохвостый	1971	-//-	134-71
19.	узкочерепная полевка	1975	-//-	272-75
20.	красная полевка	1984	-//-	898-84
21.	бурозубка (<i>Sorex</i> spp.)	2010	Иркутская область Иркутский район	<i>Sorex</i> 18-10*

Примечание: *отмечены штаммы, информация об источниках изоляции которых взята из источников литературы.

Таким образом, исходя из полученных результатов и анализа научной литературы, можно заключить, что ВКЭ-ЕС успешно интродуцировался в экосистемы Западной и Восточной Сибири, при этом основной переносчик и спектр мелких млекопитающих, поддерживающих циркуляцию ВКЭ-ЕС на территории региона, имеют отличия от таковых на территории Европы.

ГЛАВА 7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭВОЛЮЦИОННОГО ВОЗРАСТА ПОПУЛЯЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА НА ТЕРРИТОРИИ ЗАПАДНОЙ И ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

Одной из задач нашего исследования было установление эволюционного возраста ВКЭ-ЕС и времени дивергенции западносибирского и восточносибирского вариантов вируса на территории Сибири.

Для этих целей нами осуществлен выбор наиболее подходящей модели для реконструкции эволюционной истории ВКЭ-ЕС. Для такой реконструкции мы воспользовались моделью SRD06 (Shapiro V., 2006), разделяющую массив генетических данных на 1+2 и 3 позицию кодона (два дата сета). Для каждого из двух дата сетов использовалась рекомендованная для этого варианта анализа модель эволюции нуклеотидов НКУ+I+G (Shapiro V., 2006).

Для тестирования возможности датировки филогенетического древа временем изоляции штаммов и выбора наиболее подходящей модели реконструкции были использованы методы Path sampling и Stepping-Stone sampling (PS / SS) (Baele G., 2012, 2013).

Сравнивались четыре типа эволюционных реконструкций: 1) Байесовский скаплот со строгими молекулярными часами и датировкой временем изоляции штаммов; 2) Байесовский скаплот со строгими часами, недатированное древо; 3) Байесовский скаплот с расслабленными часами (логнормальные часы) и датировкой временем изоляции штаммов; 4) Байесовский скаплот с расслабленными часами (логнормальные часы), недатированное древо (Табл. 7.1).

Для филогенетических построений применялся метод Монте-Карло по схеме марковской цепи (МСМС). В анализе задавалось 100 млн. генераций Марковских цепей, с сохранением результатов каждой 5000 генерации

(общее количество деревьев для каждого прогона = 20 000). Значение ESS во всех случаях было более 300.

Для PS/SS анализа задавалось 300 шагов, каждый из которых включал 400000 генераций Марковских цепей.

Воспроизводимость каждого анализа была проверена путем трех независимых прогонов с использованием программы BEAST. Сходимость нескольких прогонов МСМС и эффективные размеры выборки (ESS) оценивались с помощью программы Tracer v.1.7.1 (Rambaut A., 2018). Расчет времени до возникновения общего предка (tMRCA) и скорости замещения были оценены с интервалом высокой апостериорной плотности (вероятности) 95% (HPD). Комплексное сравнение четырех моделей, проведенное с помощью методов PS/SS, показало, что наибольшим значением маргинального правдоподобия обладает модель Байесовского скаплота со строгими молекулярными часами и датировкой временем изоляции штаммов.

Значение предельного правдоподобия для каждой из моделей показано в таблице 7.1.

Таблица 7.1 - Выбор модели для байесовского филогенетического анализа ВКЭ-ЕС

Наименование эволюционной модели	Marginal likelihood (предельная вероятность)	
	PS	SS
Байесовский скаплот со строгими часами и датировкой временем изоляции штаммов	-35347.55	-35348.14
Байесовский скаплот со строгими часами, недатированное древо	-35391.39	-35393.09
Байесовский скаплот с расслабленными часами (логнормальные часы) и датировкой временем изоляции штаммов	-35353.82	-35354.63
Байесовский скаплот с расслабленными часами (логнормальные часы), недатированное древо	-35370.36	-35372.57

**Примечание:* Лучшая модель с максимальным значением (с учетом знака) маргинального правдоподобия выделена жирным шрифтом.

Таким образом, на основании проведенного анализа нами было показано, что для реконструкции эволюционной истории ВКЭ-ЕС наиболее подходящей моделью является модель Байесовского скаплота со строгими молекулярными часами и датировкой временем изоляции штаммов.

На основании полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС было реконструировано филогенетическое древо (Рис. 7.1). Самое позднее время изоляции штамма ВКЭ-ЕС в нашем исследовании - 2019 г., оно было принято за ноль по временной шкале (следующие оценки tMRCA были представлены в годы до 2019 г.).

На основании проведенного нами филогенетического анализа были получены следующие результаты: общий предок всех представителей ВКЭ-ЕС возник около 1030 лет назад (tMRCA=1030; с 95 % доверительным интервалом (HPD) 607-1521 лет).

Далее около 964 лет назад (tMRCA=964; 95% HPD, 624-1413 лет) ВКЭ-ЕС дивергировал на две группы. Первая, наиболее обширная из них, включает в себя штаммы из Европы, России и Южной Кореи, выделенные с 1953 по 2018 гг. Вторую группу образуют штаммы из Северной Европы (Дания, Швеция, Норвегия), а также Великобритании, которые были изолированы в период с 2008 по 2019 гг.

Первая группа включает два кластера. Кластер образован штаммами из Чешской Республики (*Vlasaty*, *Huyp*, *Tobrman*, *Petracova* и *Kubinova*), штаммами из Австрии (*Neudoerfl* и *A104*), тремя штаммами из Словакии (*I14*, *CGI223*, *285*), одним штаммом (*AS33*) из Германии и девятью штаммами из Финляндии (*Joutseno*, *Kuutsalo 2015*, *Kuutsalo 14 2017*, *EspooE266*, *K16*, *K12*, *K13*, *K14*, *K15*). Первая клада из этого кластера включает штаммы, изолированные в 1953 г. от больных КЭ людей в Чехии и прототипный штамм ВКЭ-ЕС *Neudoerfl*. tMRCA для группы штаммов из Чехии (за исключением штамма *Kubinova*) составляет 936 лет (95% HPD, 594-1359).

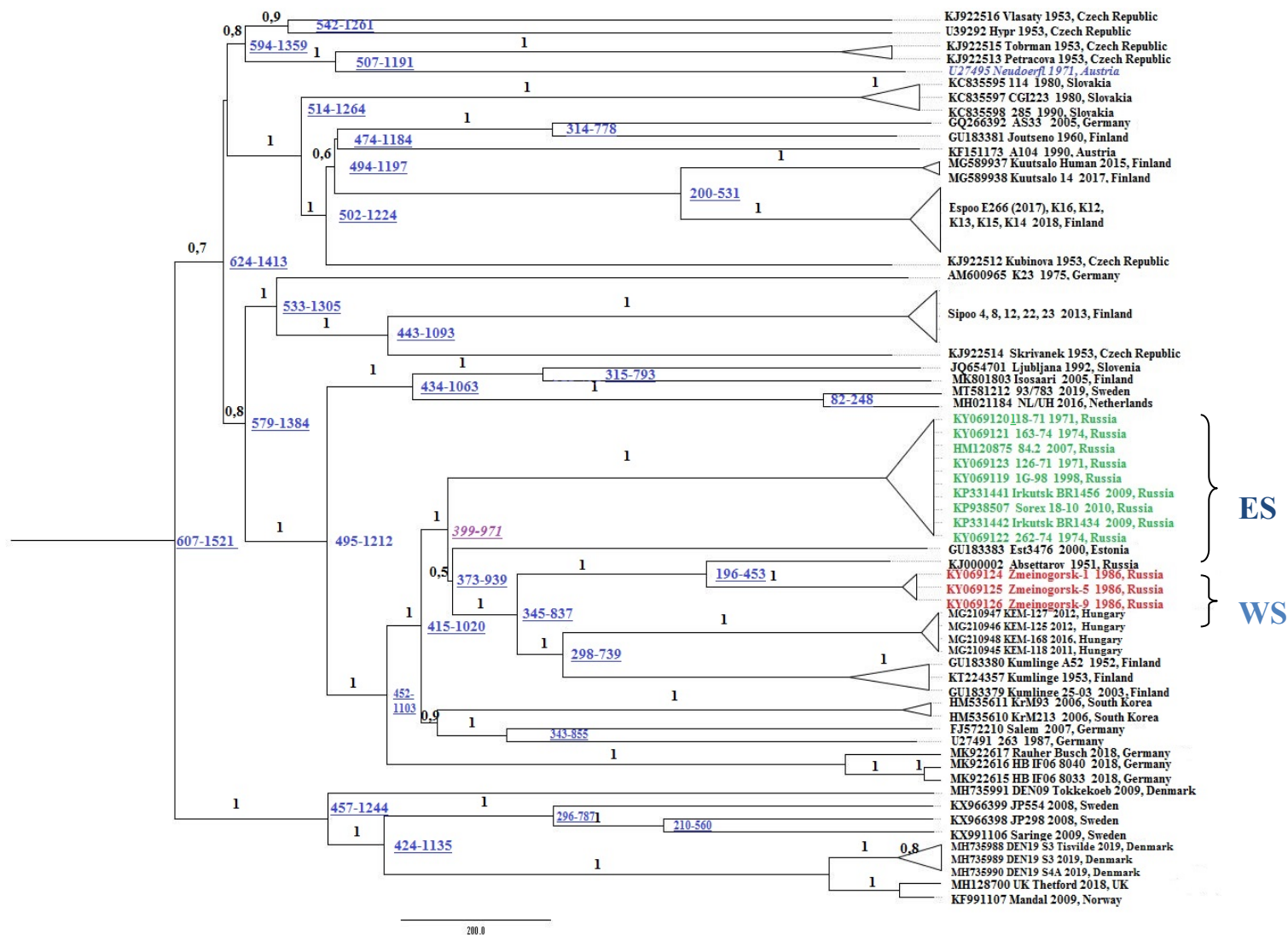


Рисунок 7.1 - Реконструированное филогенетическое древо ВКЭ-ЕС по эволюционной модели Байесовского скаплота со строгими часами и датировкой временем изоляции штаммов. Шкала показана в годах.

Штамм *Kubinova* образует кладу с немецкими, финскими и австрийскими штаммами, он отделился от них около 826 лет назад (95% HPD, 502-1224).

Штамм *Neudoerfl* генетически наиболее близок к штаммам *Petracova* и *Tobrman*. С индексом апостериорной вероятности равной 1 эта подгруппа отделилась от общего предка около 814 лет назад (95% HPD, 507-1191).

Вторая кладка включает штаммы из Словакии (tMRCA=859; 95% HPD, 514-1264), штамм *AS33* из Германии (год выделения 2005), штамм *A104* (1990) из Австрии и штамм *Joutseno* (1960) из Финляндии (tMRCA=811; 95% HPD, 474-1184). Группа остальных штаммов из Финляндии, входящих во вторую кладку, является филогенетически более молодой, ее возраст составляет около 350 лет (95% HPD, 200-531).

Кластер II включает в себя штаммы из Германии, Финляндии, Чехии, Словении, Швеции, Нидерландов, России, Эстонии, Венгрии и Южной Кореи. Эта группа отделилась от ближайшего предшественника около 936 лет назад (95% HPD, 579-1384). Отдельную кладку в этом кластере образовали штаммы *K23* из Германии (tMRCA=893; 95% HPD, 533-1305), штаммы подгруппы *Sipoo* из Финляндии и штамм *Skrivaneck* из Чехии (tMRCA=744; 95% HPD, 443-1093). Следующий обширный подкластер отделился от ближайшего общего предка приблизительно 825 лет назад (95% HPD, 495-1212). tMRCA для группы, образованной штаммами *Ljubljana* (Словения), *Isosaari 2005* (Финляндия), *93/783* (Швеция) и *NL/UH* (Нидерланды) составило 711 лет (95% HPD, 434-1063). Следующая подгруппа отделилась от общего предка примерно 745 лет назад (95% HPD, 452-1103). Она образует кластер, к которому относятся штаммы из России, а также штаммы из Западной, Восточной и Северной Европы и Южной Кореи.

tMRCA для клады, в которую входят штаммы *118-71*, *163-74*, *84.2*, *126-71*, *1G-98*, *Irkutsk 1456 BR*, *Sorex 18-10*, *Irkutsk 1434 BR*, *262-74*, и которую мы в нашем исследовании обозначили как восточносибирский вариант ВКЭ-ЕС, составило около 663 лет (95% HPD, 399-971). Штаммы,

которые относятся к этой кладе, были изолированы на территории Восточной Сибири в период с 1971 г. по 2010 г. В то время как штаммы, которые в нашем исследовании были отнесены к западносибирскому варианту ВКЭ-ЕС (*Zmeinogorsk-1*, *Zmeinogorsk-5*, *Zmeinogorsk-9*) образовали другую кладу, которая филогенетически является более молодой. tMRCA для нее составило 314 лет (95% HPD, 196-453). Штаммы, отнесенные к этой кладе, были выделены в 1986 г. на территории Западной Сибири из иксодовых клещей. Вместе с этими штаммами также кластеризуется штамм *Absettarov*, изолированный на территории Ленинградской области в 1951 г.

tMRCA для клады, образованной штаммами *KEM-127*, *KEM-125*, *KEM-168*, *KEM-118* из Венгрии, и финскими штаммами (*KumlingeA52*, *Kumlinge 1953*, *Kumlinge 25-03*) составило примерно 508 лет (95% HPD, 298-739).

Следующую кладу образовали штаммы из Южной Кореи (*KrM93*, *KrM213*), выделенные в 2006 г., и немецкие штаммы *Salem* и *263* (tMRCA=583; 95% HPD, 343-855). Отдельную ветвь внутри данного подкластера образуют штаммы из Германии (*RauherBusch*, *HBIF06 8040*, *HBIF06 8033*). Несмотря на то, что все три штамма были изолированы в 2018 г. tMRCA для штамма *RauherBusch* составило примерно 128 лет, а для двух других штаммов - приблизительно 22 года.

Как уже упоминалось выше, **вторую группу** на филогенетическом древе образуют штаммы из скандинавских стран и Великобритании. tMRCA для линии, образованной штаммом *DEN09 Tokkekoeb* (Дания), составило примерно 824 года (95% HPD, 457-1244). Позднее, приблизительно 749 лет назад (95% HPD, 424-1135) от нее отделилась группа, сформированная штаммами *JP554*, *JP298* и *Saringe* из Швеции, штаммами *DEN19 S3 Tisvilde*, *DEN19 S3 2019*, *DEN19 S4A* из Дании и *UK Thetford* из Великобритании, а также штамм *Mandal* из Норвегии. tMRCA для клады, сформированной штаммами из Швеции, составило 511 лет (95% HPD, 296-787). Самой молодой оказалась клада, представленная штаммами из Дании (2019 г.

изоляции), штаммом из Великобритании (2018 г. изоляции) и Норвегии (2009 г.) (tMRCA=158; 95% HPD=82-248).

Таким образом, на основании филогенетического анализа всех полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС, имеющихся на момент наших исследований в базе данных NCBI, с помощью модели Байесовского скаплота со строгими молекулярными часами и датировкой временем изоляции штаммов осуществлена реконструкция эволюционной истории ВКЭ-ЕС. Средняя скорость нуклеотидных замен для штаммов ВКЭ-ЕС составила $1,8 \cdot 10^{-5}$ замен на сайт в год, что согласуется с данными (Uzcátegui N.Y., 2012). Нами установлено, что общий предок всех представителей ВКЭ-ЕС возник около 1030 лет назад (tMRCA=1030; с 95 % доверительным интервалом 607-1521 лет), что не противоречит данным, полученным Moureau G. и соавт. (Moureau G., 2015). Согласно их исследованию, предок ВКЭ-ЕС разошелся с общим предком остальных субтипов TBEV приблизительно 1087 лет назад (с 95% ДИ от 649 до 1610 лет). Необходимо отметить, что в наш анализ было взято гораздо большее количество штаммов ВКЭ-ЕС в связи со значительным пополнением в последние годы базы данных NCBI полногеномными последовательностями штаммов, относящихся к данному субтипу. Кроме того, определение времени существования ВКЭ-ЕС (tMRCA) с выборкой, включающей штаммы из Нидерландов, Великобритании и Дании, которые были изолированы в 2016, 2018, и 2019 гг. соответственно, ранее не проводилось. Наши данные несколько отличаются от результатов, полученных в 2020 г. Deviatkin A.A. и соавт. (Deviatkin A.A., 2020). Согласно этим данным tMRCA для ВКЭ-ЕС составило около 1632 лет (95% HPD, 814-4790). Однако важно подчеркнуть, что это исследование выполнено не на полногеномных последовательностях ВКЭ-ЕС, как в нашем случае, а при использовании последовательностей гена E.

Полученные нами данные об эволюционной истории ВКЭ-ЕС свидетельствуют о том, что популяция данного варианта вируса имеет

множество точек дивергенции и является разновозрастной, что указывает на наличие нескольких этапов заселения им экосистем Евразии. Ранее Ю.П. Джиевым и соавт. с помощью филогенетического анализа последовательностей гена E штаммов ВКЭ-ЕС и географического картирования посредством программного приложения GenGis была показана множественность этапов распространения данного субтипа вируса на территории Евразии и смена вектора его пространственной дивергенции: сначала с востока на запад, затем с запада на восток (Джиев Ю.П., 2021). Такое распространение ВКЭ-ЕС, по мнению авторов, может быть опосредовано рядом причин, в том числе деятельностью человека или естественно мигрирующими животными, которые были инфицированы или переносили на себе инфицированных клещей. Также рядом исследователей было продемонстрировано, что на значительные расстояния клещи могут переноситься птицами (Mikryukova T.P., 2014).

Большой интерес для нас представлял вопрос о времени появления ВКЭ-ЕС на территории Сибири. Время дивергенции западносибирского и восточносибирского варианта ВКЭ-ЕС от ближайшего общего предка составило 663 года (95% HPD, 399-971). При этом западносибирский вариант ВКЭ-ЕС является более молодым, tMRCA для него составляет 314 лет (95% HPD, 196-453). В общем приближении расселение ВКЭ-ЕС совпадает со временем начала освоения Сибири, при этом процесс заселения переселенцами Верхнего Приобья и предгорий Алтая начался чуть позже, во второй половине XVII века. В связи с этим нельзя исключить влияние на эволюцию ВКЭ-ЕС антропогенного фактора. Однако вряд ли этот фактор является единственным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно современным представлениям о генетической variability выделяют три основных субтипа (генотипа) ВКЭ: 1) дальневосточный субтип (генотип 1); 2) европейский или западный субтип (генотип 2); 3) сибирский субтип (генотип 3). Каждый из субтипов вируса обладает собственным ареалом, в пределах которого отмечается его абсолютное доминирование.

С помощью методов молекулярной эпидемиологии было показано, что ВКЭ-ЕС имеет обширнейший ареал – от Европы до Азии. Зоной абсолютного доминирования ВКЭ-ЕС являются Центральная и Северная Европа. Западная граница ареала ВКЭ-ЕС находится в пределах таких европейских государств как Франция и Нидерланды. Северная граница ареала проходит по Скандинавским странам, а южная – по странам Средиземноморья. Восточной границей распространения данного субтипа вируса является Южная Корея, где он был обнаружен сравнительно недавно (Kim S.Y., 2008; Yun S.M., 2009).

В настоящее время наблюдается расширение ареала ВКЭ-ЕС, увеличение уровня заболеваемости, рост числа стран, в которых регистрируются случаи КЭ, появились сведения о тяжелых случаях заболевания, ассоциированных с данным вариантом вируса.

Учитывая абсолютное доминирование ВКЭ-ЕС в Европе, его экология, генетические и фенотипические свойства достаточно хорошо изучены. Установлено, что основным переносчиком и резервуарным хозяином ВКЭ-ЕС в Европе являются клещи *I. ricinus* (Nosek J., 1970; Gaumann R., 2010; Chitimia-Dobler L., 2019; Klaus C., 2013). Выявлен спектр компетентных позвоночных хозяев ВКЭ-ЕС, играющих основную роль в резервации и передаче вируса (Chitimia-Dobler L., 2019), описаны биотопы, в которых происходит его циркуляция.

Несмотря на то, что в музейных коллекциях ряда научных учреждений Сибири на депонентном хранении уже давно находились

штаммы ВКЭ западного подтипа, их исследование с помощью современных молекулярно-генетических методов началось относительно недавно. С помощью методов молекулярной эпидемиологии было установлено, что Восточная Сибирь является восточной границей России, где выявлена циркуляция ВКЭ-ЕС. При этом источниками изоляции штаммов ВКЭ-ЕС на территории региона послужили клещи *I. persulcatus*, хотя ранее считалось, что таежный клещ обладает векторной способностью только в отношении дальневосточного и сибирского субтипов ВКЭ. Позднее появились данные, свидетельствующие об изоляции на территории Сибирского региона современных штаммов ВКЭ-ЕС, были получены доказательства участия данного субтипа в региональной инфекционной патологии.

Учитывая тот факт, что в Сибири ВКЭ-ЕС циркулирует в экосистемах значительно отличающихся от основного европейского ареала составом природных комплексов и биоценозов научный интерес представлял сравнительный анализ генетических, фенотипических свойств и экологических особенностей штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных в удаленных друг от друга точках ареала (Европа и Сибирь).

Для получения комплексной характеристики ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Сибири, нами проведено исследование генетических и фенотипических свойств штаммов вируса, изолированных на территории изучаемого региона. Кроме того, мы постарались выявить экологические особенности и установить время появления этого варианта вируса на территории Сибири.

На первом этапе наших исследований был проведен сравнительный анализ полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС и штаммов других субтипов вируса, а также некоторых представителей флавивирусов, переносимых клещами, депонированных в электронную базу данных GenBank.

В результате филогенетического анализа нами показано, что уровень различий между нуклеотидными последовательностями кодирующей части

генома у ВКЭ-ЕС и другими субтипами вируса сопоставим или даже превышает уровень различий между штаммами ВКЭ-ЕС и вирусами группы *Louping ill*. Уровень различий у штаммов ВКЭ-ЕС и других известных субтипов вируса составил: с дальневосточным субтипом – 16-17%, с сибирским субтипом – 14-16%, с байкальским субтипом – 15-16%, с гималайским субтипом и со штаммом 178-79 - 16%. В то время как уровень различий между штаммами ВКЭ-ЕС с вирусом Шотландского энцефаломиелита овец составил – 11,9-13,0%, с вирусом Греческого энцефалита коз - 14,2-14,4%, с вирусом Турецкого энцефалита овец - 14,5-14,9%, с вирусом Испанского энцефалита овец - 12,6-13,0%.

Нами установлено, что различия как в кодирующей области генома, так и в соответствующей ей последовательности полипротеина у штаммов ВКЭ-ЕС, как правило, минимальны (3,1 и 1,5% соответственно) по сравнению с другими субтипами вируса, что свидетельствует о более высокой степени генетической однородности данного варианта вируса. Исключение составили два штамма, изолированные на территории Нидерландов и Великобритании (*NL* (LC171402) и *UK-Hampshire2019* (MN661145)), существование которых значительно расширяет установленные ранее границы вариабельности внутри ВКЭ-ЕС приблизительно от 3% до 9%.

Нами осуществлен анализ полных последовательностей геномов ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Евразии. На момент проведения наших исследований в GenBank находилось 86 последовательностей полипротеина штаммов и изолятов ВКЭ-ЕС, выделенных на территории 13 европейских стран, а также в России и Южной Корее в период с 1953 по 2019 гг.

Для визуализации полученных данных нами было построено филогенетическое древо. На нем нами условно выделено пять кластеров. В **первый кластер** были включены нуклеотидные последовательности уже упомянутых выше штаммов из Нидерландов и Великобритании. **Второй кластер** сформировали штаммы из Великобритании, Дании, Норвегии и

Швеции. В **третий кластер** вошли нуклеотидные последовательности штаммов из Австрии, Германии, Словакии, Финляндии, Чехии. Внутри этого кластера выделено несколько отдельных клад. Например, самостоятельные клады сформировали штаммы из Словакии, Финляндии. При этом штаммы *Kuutsalo*, выделенные на территории острова Кутсало (Финляндия) и штаммы *Espoo* из южной части Скандинавского полуострова группировались отдельно, в соответствии с местом их изоляции.

Самым обширным оказался **четвертый кластер**, в него вошли 30 штаммов из Венгрии, Германии, Нидерландов, России, Словении, Финляндии, Чехии, Эстонии, Южной Кореи и Швеции. Внутри этого кластера также отмечено наличие отдельных клад, сгруппированных по территориальному признаку. Так, например, отдельные клады сформировали штаммы из Германии, Южной Кореи, Восточной и Западной Сибири.

В **пятый кластер** вошли штаммы из Германии, Финляндии и Чехии. Примечательно, что штаммы «*Sipoo*» из Финляндии, вошедшие в состав этого кластера, не группировались со штаммами «*Espoo*» из третьего кластера, хотя места их изоляции расположены на территории архипелага всего в 20 км друг от друга. В то время как штаммы с о. Куутсало (Котка), находящегося примерно в 140 км от места изоляции штаммов «*Espoo*» формировали с ними общую кладу.

Несмотря на имеющиеся исключения, как правило, на филогенетическом древе штаммы ВКЭ-ЕС кластеризовались по территориальному признаку. Было показано, что максимальный уровень сходства наблюдается между штаммами, выделенными в одном регионе. Нами осуществлен анализ гомологии и кластеризации штаммов в зависимости от года и источника их изоляции (клещи, больные КЭ люди). Прямой корреляционной связи между уровнем гомологии нуклеотидных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС со временем и источником их изоляции не выявлено.

На основании проведенных исследований нами было высказано предположение о том, что кластеризация штаммов ВКЭ-ЕС на дендрограммах в большей степени зависит от места их изоляции, нежели от источника и года их выделения.

Для выявления генетических особенностей ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Сибири, нами были расшифрованы полногеномные последовательности восьми штаммов. Кроме того, в изучаемую выборку мы также включили четыре штамма из Восточной Сибири - *IrkutskBR99-08* (KP331441), *IrkutskBR1456-09* (KP331443), *IrkutskBR1434-09* (KP331442), *Sorex 18-10* (KP938507) (Adelshin R.V., 2015) и один штамм 84.2 из Алтая (HM120875).

В результате анализа 140 полногеномных последовательностей (из них 39 – ВКЭ-ЕС), было установлено, что штаммы из Сибири входят в состав группы ВКЭ-ЕС. На филогенетическом древе штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири образуют две группы, соответствующие географическому положению мест их изоляции, которые мы условно обозначили как западносибирский и восточносибирский варианты.

Штаммы ВКЭ-ЕС из Западной Сибири на филогенетическом древе преимущественно группировались с европейскими штаммами. К штаммам восточносибирского варианта ВКЭ-ЕС генетически наиболее близкими оказались штаммы из Южной Кореи. Гомология западносибирских и восточносибирских штаммов с прототипным штаммом ВКЭ-ЕС *Neudoerfl* составила 97,6% и 97,4% соответственно. Различия по кодирующей части генома в группе Алтайских штаммов не превышали 0,05% (гомология >99,9%). Гомология штаммов из Восточной Сибири составила 99,79-99,9%. При этом самый высокий уровень различий наблюдался между восточносибирскими штаммами *IG-98* и *IrkutskBR1456-09* и *IrkutskBR99-08* - 0,21%. Гомология между штаммами, выделенными в 1971 году (*126-71* и *118-71*) и штаммом *Sorex 18-10* 2010 года изоляции составила 99,87-99,89%. Полученные данные свидетельствуют о том, что на территории Сибири на

протяжении как минимум сорока лет циркулирует популяция ВКЭ-ЕС, характеризующаяся высокой степенью стабильности генома.

Нами показано, западносибирский и восточносибирский варианты ВКЭ-ЕС вне зависимости от источника выделения различаются между собой по сочетаниям аминокислотных замен в 29 позициях в 9 из 10 белков вируса. В белке NS2B, который играет важную роль в репродукции ВКЭ, замены отсутствовали.

Наряду с установлением генетической структуры штаммов ВКЭ-ЕС, выделенных на территории Западной и Восточной Сибири, мы сочли необходимым оценить их фенотипические характеристики, которые являются важной составляющей в полной мере характеризующей природу и свойства вируса и важны с точки зрения практической вирусологии.

В ходе проведенного исследования нами отмечено, что популяция ВКЭ-ЕС на территории Сибири гетерогенна по фенотипическим свойствам. Установлено, что штаммы ВКЭ их Сибирского региона обладают высокой нейровирулентностью, но часть из них, аналогично штаммам из Европы, проявляет низкую инвазивность. Изучение генетических маркеров, связанных с особенностями внутриклеточной репродукции, показало, что штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири обладают хорошими адаптивными способностями и, следовательно, вирус может легко приспосабливаться к циркуляции в составе разнообразных биоценозов на территории различных ландшафтно-географических зон.

Было установлено, что все исследуемые штаммы имеют делецию в вариабельной части 3'-некодирующей области генома, сравнимую по длине с таковой у штамма *Hupr*. Связи между наличием делеции, вирулентностью и источником изоляции штаммов не установлено. Механизм возникновения делеций в 3'-некодирующей области генома, их роль как факторов вирулентности и их значение для эволюции вирусных популяций остаются неясными (Belikov S., 2014) и требуют дальнейших исследований.

С целью выявления возможных особенностей экологии ВКЭ-ЕС, циркулирующего за пределами основного европейского ареала нами получена эколого-географическая характеристика районов изоляции штаммов на территории Сибири. В связи с тем, что выборка исследуемых штаммов была малочисленной и не могла дать объективной информации об особенностях экологии ВКЭ-ЕС в Сибири, то дополнительно в анализ была включена информация о местах изоляции штаммов, данные о которых были получены нами из научных источников. В ходе проведенных исследований было показано, что на территории Западной Сибири ВКЭ-ЕС циркулирует на территории Алтайского края, Республики Алтай, Новосибирской и Омской областей. В Восточной Сибири ВКЭ-ЕС был изолирован из материала, собранного на территории Эхирит-Булагатского и Иркутского районов Иркутской области и Бичурского района Республики Бурятия. На сегодняшний день Бичурский район является восточной границей России, где выявлена циркуляция ВКЭ-ЕС.

Анализ эколого-географической характеристики районов изоляции штаммов свидетельствует о том, что на территории Западной и Восточной Сибири ВКЭ-ЕС существует в условиях очаговых экосистем, отличающихся разнообразием климата, рельефа, ландшафтов, флоры и фауны. Климат районов, в которых выявлена циркуляция ВКЭ-ЕС достаточно суров, варьирует от умеренно- до резко континентального, от засушливого до увлажненного. Штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири были изолированы на территориях с различным типом рельефа – от равнин (от 41 м н.у.м.) до среднегорья (выше 2200 м н.у.м.). Районы изоляции штаммов отличаются разнообразием ландшафтов (от степного до горно-таежного).

С целью выявления спектра переносчиков и резервуарных хозяев, способных поддерживать циркуляцию ВКЭ-ЕС на территории Сибири, нами проведен анализ источников изоляции штаммов данного субтипа из разных видов иксодовых клещей и мелких млекопитающих.

Исходя из того, что из 23 штаммов ВКЭ-ЕС из Сибири 19 были изолированы от таежных клещей, мы высказали предположение, что основным переносчиком и резервуарным хозяином данного субтипа вируса на территории Сибири является клещ *I. persulcatus*. Хотя ВКЭ-ЕС на территории Западно-Сибирского региона обнаружен и в других видах клещей рода *Ixodes*: *I. trianguliceps* и *I. pavlovskyi*, а также в клещах рода *Dermacentor*: *D. marginatus* и *D. reticulatus*. Полученные результаты опровергают ранее существовавшее мнение о том, что переносчиком ВКЭ-ЕС является только клещ *I. ricinus*, а таежный клещ обладает векторной способностью только в отношении дальневосточного и сибирского субтипов вируса.

На основе собственных данных и анализа источников литературы нами сделано заключение, что циркуляция ВКЭ-ЕС на территории Сибири поддерживается несколькими видами грызунов, преимущественно полевками (красно-серая, красная, плоскочерепная, большеухая, узкочерепная, полевка-экономка), а также сусликами (суслик длиннохвостый), насекомоядными (бурозубка), зайцеобразными (алтайская пищуха) и некоторыми видами наземно гнездящихся птиц.

Таким образом, исходя из полученных результатов, нами сделано заключение, что ВКЭ-ЕС успешно интродуцировался в экосистемы Западной и Восточной Сибири, при этом основной переносчик и спектр мелких млекопитающих, поддерживающих циркуляцию данного варианта вируса на территории региона, имеют отличия от таковых на территории Европы.

Одной из интересных задач нашего исследования было установление эволюционного возраста ВКЭ-ЕСи времени дивергенции западносибирского и восточносибирского вариантов вируса на территории Сибири.

Для этих целей был осуществлен выбор модели наиболее подходящей для реконструкции эволюционной истории ВКЭ-ЕС. Тестирование четырех типов эволюционных моделей показало, что наиболее подходящей для реконструкции эволюционной истории ВКЭ-ЕС является модель Байесовского скаплота со строгими молекулярными часами и датировкой

временем изоляции штаммов. На основании филогенетического анализа всех полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ-ЕС, имевшихся на момент начала наших исследований в базе данных NCBI, было установлено, что общий предок всех представителей ВКЭ-ЕС возник около 1030 лет назад (tMRCA=1030; с 95 % доверительным интервалом 607-1521 лет).

Полученные нами данные об эволюционной истории ВКЭ-ЕС свидетельствуют о том, что популяция данного варианта вируса имеет множество точек дивергенции и является разновозрастной, что указывает на наличие нескольких этапов заселения им экосистем Евразии. Время дивергенции западносибирского и восточносибирского варианта ВКЭ-ЕС от ближайшего общего предка составило 663 года (95% HPD, 399-971). При этом западносибирский вариант ВКЭ-ЕС является более молодым, tMRCA для него составляет 314 лет (95% HPD, 196-453).

Таким образом, на основании изучения генетических, фенотипических свойств и экологических особенностей нами получена комплексная характеристика ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Сибири, а также реконструирована его эволюционная история. Было доказано, что ВКЭ-ЕС на территории Сибири существует в условиях очаговых экосистем, значительно отличающихся от европейского ареала данного субтипа вируса. Однако несмотря на то, что ВКЭ-ЕС циркулирует на территориях, значительно различающихся по климатическим условиям, рельефу, ландшафту, имеет другого основного переносчика и резервуарных хозяев он обладает достаточно высокой степенью стабильности генома, а его различия не превышают таковых у основной части штаммов ВКЭ-ЕС из Европы. Исключение составляют штаммы из Нидерландов и Великобритании, чьи генетические отличия значительно превышают ранее установленные максимальные границы вариабельности для ВКЭ-ЕС в 3,1%.

ВЫВОДЫ:

1. Получена комплексная характеристика ВКЭ-ЕС, циркулирующего на территории Западной и Восточной Сибири. Показано, что штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири генетически сходны со штаммами из европейской части ареала и с представителями из Южной Кореи. Гомология составляет от 92- 100%.

2. Сибирская популяция ВКЭ-ЕС на обследованных территориях представлена двумя группами штаммов - восточносибирский и западносибирский варианты. Эти варианты отличаются друг от друга по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B.

3. Установлено, что кластеризация исследуемых штаммов на дендрограммах в большей степени зависит от территории изоляции образцов, нежели от источника и года изоляции.

4. Отмечено, что популяция ВКЭ-ЕС на территории Сибири гетерогенна по фенотипическим свойствам. Установлено, что штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири обладают высокой нейровирулентностью, но часть из них, аналогично штаммам из Европы, проявляет низкую инвазивность.

5. Изучение генетических маркеров, связанных с особенностями внутриклеточной репродукции, показало, что штаммы ВКЭ-ЕС из Сибири обладают хорошими адаптивными способностями и, следовательно, данный вариант вируса может легко приспосабливаться к циркуляции в различных климатогеографических условиях, в составе разнообразных биоценозов на территории различных ландшафтно-географических зон.

6. Состав основных переносчиков и резервуарных хозяев ВКЭ-ЕС в Сибири имеет свои особенности и существенно отличается от такового на территории Европы. Однако, несмотря на это, гомология штаммов ВКЭ-ЕС, изолированных в разных точках ареала вируса (от скандинавских стран на западе до восточных границ ареала), гораздо выше, чем степень гомологии у штаммов дальневосточного и сибирского субтипов.

7. С помощью филогенетического анализа, выявлено, что дивергенция ВКЭ-ЕС от общего западного предка произошла около 1030 (с 95% ДИ 607-1521) лет назад, а расхождение сибирской линии на два геноварианта (западносибирская и восточносибирская ветви), произошло около 663 лет назад (с 95% доверительным интервалом от 399 до 971 гг.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Верховина М.М., Молекулярная эпидемиология и экология вируса клещевого энцефалита в Восточной Сибири: диссертация ... доктора биологических наук: 03.02.02. - Москва, 2015. - 369 с.
2. Верховина М.М., Злобин В.И., Козлова И.В. и др. Молекулярная эпидемиология и экология вируса клещевого энцефалита в Восточной Сибири. Монография. – Новосибирск: АНС «СибАк», 2017. – 298 с.
3. Верховина М.М., Козлова И.В., Дорощенко Е.К. и др. Характеристика генетических и фенотипических свойств штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных из различных источников на территории Восточной Сибири //Acta Biomedica Scientifica. - 2017. - V. 2, №5 (1). P. 76. doi:10.12737/article_59e8bcec3d9752.57563902.
4. Вотяков В.И., Злобин В.И., Мишаева Н.П. Клещевые энцефалиты Евразии (вопросы экологии, молекулярной эпидемиологии, нозологии, эволюции). Н: Наука. - 2002. - 438 с.
5. Давыдова Т.В., Дамбаев В.Б. Краткая физико-географическая характеристика Среднехилокского (Бичурского) степного района // Современные проблемы науки и образования – 2014 .- №6 (прил. "Географические науки"). - С. 4.
6. Данчинова Г.А. Очаги КЭ в Прибайкалье в условиях антропогенной трансформации ландшафтов: автореф. дис. ...канд. биол. наук. – М., 1988. – 24 с.
7. Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Козлова И.В. и др. Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования // Вопросы вирусологии. - 2012. - Т. 57 (4). - С. 13-18.
8. Джигоев Ю.П., Букин Ю.С., Козлова И.В., Степаненко Л.А., Киселев Д.О., Злобин В.И. Глава 5. Генетическая изменчивость вируса клещевого энцефалита: возможность рекомбинаций и особенности пространственной

- эволюции европейского субтипа / в кн: Клещевой энцефалит в XXI веке / под ред. акад. РАН В.И. Злобина. – М.: Наука, 2021. – С. 100-118.
9. Добрикова Е.Ю., Плетнев А.Г. Анализ 5'- и 3'-концевых некодирующих областей генома // Биоорганическая химия. - 1995. - Т. 21. - №7. - С. 528-534.
10. Злобин В.И., Горин О.З. Клещевой энцефалит: Этиология. Эпидемиология и профилактика в Сибири. Н: Наука, 1996. 177 с.
11. Козлова И.В., Верховина М.М., Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Ткачев С.Е., Карань Л.С., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Сунцова О.В., Парамонов А.И., Черноиванова О.О., Ревизор А.О., Злобин В.И. Генетические и биологические свойства оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, циркулирующей в Восточной Сибири // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2012. - №3(64). - С.14-25.
12. Козлова И.В., Демина Т.В., Ткачев С.Е., Савинова Ю.С., Дорощенко Е.К., Джигоев Ю.П., Сунцова О.В., Верховина М.М., Парамонов А.И., Злобин В.И., Тикунова Н.В. Характеристика вируса клещевого энцефалита Европейского субтипа, циркулирующего на территории // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2016. - Т.15. - №6(91). - С. 30-40.
13. Козловская Л.И., Осолодкин Д.И., Карганова Г.Г. Анализ молекулярной динамики белков E вариантов ВКЭ на основе разности корреляционных матриц // Медицинская вирусология. – 2013. - Т.27. - №2. – С. 42-53.
14. Коренберг Э.И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в лесной зоне, и стратегия их профилактики: изменение приоритетов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. - №5(72). - С. 7-17.
15. Локтев В.Б., Терновой В.А., Нетесов С.В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита // Вопросы вирусологии. - 2007. - Т. 52. - №5. - С. 10-16.
16. Ляпустин В.Н., Грицун Т.С., Машкевич В.А. Гликозилированные и негликозилированные белки вируса клещевого энцефалита,

- синтезирующиеся в перевиваемых клетках почки эмбриона свиньи // Вопросы вирусологии. - 1987. - Т. 32. - № 3. - С. 337-342.
17. Морозова О.В. Проблемы и перспективы профилактики, диагностики и лечения клещевого энцефалита // Российский медицинский журнал. - 2014. - Т. 20 (6). – С. 26-31.
18. Оберт А.С., Курепина Н.Ю., Безруков Г.В., Меркушев О.А., Черкашина Е.Н., Калинина У.В. Иксодовые клещи – переносчики трансмиссивных инфекционных заболеваний человека в Алтайском крае. // Известия АО РГО. - 2015. - №2 (37). - С. 82-89.
19. Овчинникова Э.А., Карпович Л.Г., Левкович Е.Н. Изучение терморезистентности штаммов вируса комплекса клещевого энцефалита, обладающих различной нейровирулентностью для лабораторных животных // Вопросы вирусологии. - 1967. - №5. - С. 607.
20. Савинова Ю.С. Европейский субтип вируса клещевого энцефалита. Обзор литературы // Acta Biomedica Scientifica. 2021. №4. - С. 100-113.
21. Сидорова Е.А., Бондарюк А.Н., Мельникова О.В. и др. Эпидемиология тяжелых форм клещевого энцефалита с летальным исходом, изоляция и характеристика возбудителя // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. - 2019. - №37 (37). - С. 31-32.
22. Ткачев С.Е., Боргояков В.Ю., Чикова Е.Д., Панов В.В. Генетическое пазнообразие ВКЭ на территории Новосибирского НЦ // Национальные приоритеты России. – 2011. - №2 (5). - С. 154-155.
23. Ткачев С.Е. Генетическая вариабельность вируса клещевого энцефалита в природных очагах Новосибирска и его окрестностей : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.01.03 / [Место защиты: Ин-т хим. биологии и фундамент. медицины СО РАН]. - Новосибирск, 2015. - 192 с.
24. Чумаков М.П., Рубин С.Г., Линев М.Б. Три антигенных типа вируса клещевого энцефалита, их зависимость от основных видов клещей-переносчиков и географическое распространение // Вопр. мед. вирусологии. – 1975. - С. 175-185.

25. Щучинова Л.Д., Козлова И.В., Злобин В.И. Ведущая роль клещей рода *Dermacentor* в поддержании природных очагов клещевого энцефалита в Республике Алтай // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2013. № 6 (73). - С. 16-20.
26. Якименко В.В., Ткачев С.Е., Макенов М.Т., Малькова М.Г., Любенко А.Ф., Рудакова С.А., Щучинова Л.Д., Петрова Ю.А., Танцев А.К., Тикунов А.Ю., Тикунова Н.В. О распространении вируса клещевого энцефалита субтипа в Западной Сибири и на Алтае // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. - 2015. - №27. - С. 29-35.
27. Якименко В.В., Малькова М.Г., Тюлько Ж.С., Ткачев С.Е., Макенов М.Т., Василенко А.Г. Трансмиссивные вирусные инфекции Западной Сибири (региональные аспекты эпидемиологии, экологии возбудителей и микроэволюции). – Омск: Издательский центр КАН, 2019. – 312 с.
28. Achazi K., Ružek D., Donoso-Mantke O., Schlegel M., Sheikh Ali H., Wenk M. et al. Rodents as Sentinels for the Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus // Vector-borne and zoonotic diseases. - 2011. - V.11. - №6. – P. 641-664.
29. Adelshin R.V., Melnikova O.V., Trishina Y.N., et al. Tick-borne encephalitis virus isolates features from natural foci of Pribaikalie (Eastern Siberia, Russia) // J. Dis. Epidemiol. - 2015. - V.1. - №1. - P. 1-4.
30. Adelshin R.V., Melnikova O.V., Karan L.S., et al. Complete Genome Sequences of Four European Subtype Strains of Tick-Borne Encephalitis Virus from Eastern Siberia, Russia // Genome Announc. - 2015. - V.3. - № 3. pii: e00609-15. doi: 10.1128/genomeA.00609-15.
31. Agergaard C.N., Rosenstjerne M.W., Bødker R., Rasmussen M., Andersen P.H. S., Fomsgaard A. New tick-borne encephalitis virus hot spot in Northern Zealand, Denmark, October 2019 // Euro Surveill. – 2019. – V. 24. - №43: doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.43.1900639.

32. Allison S.L., Stadler K., Mandl C.W., et al. Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form // *J. Virol.* - 1995. – V. 69. - №9. - P. 5816-5820.
33. Ambrose R.L., Mackenzie J.M. A Conserved Peptide in West Nile Virus NS4A Protein Contributes to Proteolytic Processing and Is Essential for Replication // *J. Virol.* - 2011. - V. 85. - №21. - P. 11274-11282. doi: 10.1128/JVI.05864-11.
34. Andersen N.S., Bestehorn M., Dobler G. et al. Phylogenetic characterization of tick-borne encephalitis virus from Bornholm, Denmark // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2018. – V.10. – P. 533–539. doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.12.008.
35. Asghar N., Lindblom P., Melik W., Lindqvist R., Haglund M., Forsberg P., Overby A.K., Andreassen A., Lindgren P.E., Johansson M. Tick-borne encephalitis virus sequenced directly from questing and blood-feeding ticks reveals quasispecies variance // *PLoS ONE.* - 2014. – V.9. - № 7. - E103264.
36. Asghar N., Pettersson J., Dinnetz P., Andreassen Å., Johansson M. Deep sequencing analysis of tick-borne encephalitis virus from questing ticks at natural foci reveals similarities between quasispecies pools of the virus // *Journal of General Virology.* - 2017. – V. 98. – P. 413-421. doi:10.1099/jgv.0.000704.
37. Ávila-Pérez G., Nogales A., Martín V., Almazán F., Martínez-Sobrido L. Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus // *Viruses.* – 2018. - V. 10. – P.597. <https://doi.org/10.3390/v10110597/>.
38. Avirutnan P., Hauhart R.E., Somnuk P., et al. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation // *J. Immunol.* – 2011. – V.187. P. 423-433.
39. Baele G., Lemey P., Bedford T., Rambaut A., Suchard M.A., Alekseyenko A.V. Improving the accuracy of demographic and molecular clock model comparison while accommodating phylogenetic uncertainty // *Mol. Biol. Evol.* - 2012. - V.29. P. 2157–2167. doi.org/10.1093/molbev/mss084.

40. Baele G., Li W.L., Drummond A.J., Suchard M.A., Lemey P. Accurate model selection of relaxed molecular clocks in bayesian phylogenetics // *Mol. Biol. Evol.* - 2013. - V. 30. - P. 239-243. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss243>
41. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties // *PLoS One.* – 2014. - V. 9(4). - e94946. doi: 10.1371/journal.pone.0094946. eCollection 2014.
42. Best S.M., Morris K.L., Shannon J.G., et al. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist // *J. Virol.* - 2005. - V. 79. - №20. - P. 12828-12839.
43. Boelke M., Bestehorn M., Marchwald B., Kubinski M., Liebig K., Glanz J., Schulz C., Dobler G., Monazahian M., Becker S.C. First Isolation and Phylogenetic Analyses of Tick-Borne Encephalitis Virus in Lower Saxony, Germany // *Viruses.* - 2019. – V. 11. - №5. - E462.
44. Bogovic P., Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management // *World J. Clin. Cases.* - 2015. - V. 3. - №5. - P. 430-441. doi: 10.12998/wjcc.v3.i5.430.
45. Borde J.P., Zajkowska J. Tick-borne encephalitis in adults. Chapter TBE in Adults. In: *TBE.* Dobler G. - 2017. - P. 1-29.
46. Chambers T.J., Hahn C.S., Galler R., et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication // *Annu. Rev. Microbiol.* - 1990. - V. 44. - P. 649-688. doi: 10.1146/annurev.mi.44.100190.003245.
47. Chambers T.J., Nestorowicz A., Amberg S.M., et al. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication // *J. Virol.* - 1993. - V. 67. - №11. - P. 6797 - 6807.
48. Chen C.J., Kuo M.D., Chien L.J., et al. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA // *J. Virol.* - 1997. - V. 71. - №5. - P. 3466-3473.

49. Chen J., Ng M.M., Chu J.J. Activation of TLR2 and TLR6 by dengue NS1 protein and its implications in the immunopathogenesis of dengue virus infection // PLoS Pathog. – 2015. - V.11: e1005053.
50. Chititmia-Dobler L., Mackenstedt U., Kahl O., et al. Transmission/Natural cycle. Chapter 3. In: Dobler G., Erber W., Broker M., Schmitt H.J. eds. The TBE-book. 2nd ed. Singapore: Global Health Press; 2019. - P. 62-86. doi: 10.33442/978-981-14-0914-1_3.
51. Camprubí D., Moreno-García E., Almuedo-Riera A., Martínez M.J., Navarro A., Martínez-Hernández E., Muñoz J., Ambrosioni J. First imported case of tick-borne encephalitis in Spain – was it alimentary? // Travel Medicine and Infectious Disease. 2020. - V. 37, 101701. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101701>.
52. Cotty A. Distribution et fluctuation de populations *Ixodes ricinus* (L.), *Haemaphysalis punctata* (Can. & Franz.) et *Dermacentor marginatus* (Sulzer) (Acarina, Ixodoidea) en Suisse // Bull. Société Entomol. Suisse. - 1986. - V. 59. - P. 139-145.
53. Crooks A.J., Lee J.M., Easterbrook L.M., et al. The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell // J. Gen. Virol. - 1994. - V. 75. - №5. - P. 3453-3460. doi: 10.1099/0022-1317-75-12-3453.
54. Csank T., Bhide K., Bencúrová E., et al. Detection of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in birds in Slovakia, using a universal primer set // Arch Virol. – 2016. - V.161. P.1679-1683.
55. Dai X., Shang G., Lu S., Yang J., Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China // Emerg. Microbes Infect. - 2018. - V. 7. - №1. - P. 74.
56. Danielova V., Daniel M., Schwarzova L., Materna J., Rudenko N., Golovchenko M., et al. Integration of a tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato into mountain ecosystems, following a shift in the altitudinal limit of distribution of their vector, *Ixodes ricinus* (Krkonose

- mountains, Czech Republic) // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2010. - V.10. – P.223-230.doi: 10.1089/vbz.2009.0020.
- 57.de Graaf J.A., Reimerink J.H., Voorn G.P., Bij de Vaate E.A., de Vries A., Rockx B., Schuitemaker A., Hira V. First human case of tick-borne encephalitis virus infection acquired in the Netherlands, July 2016 // Euro Surveill. – 2016. - V. 21. - № 33.
- 58.Dekker M., Laverman G.D., de Vries A., Reimerink J., Geeraedts F. Emergence of tick-borne encephalitis (TBE) in the Netherlands // Ticks Tick Borne Dis. – 2019. - V.10. - №1. – P. 176-179. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.10.008.
- 59.De Meeûs C., Beati L., Delay C., Aeschlimann A., Renaud F. Sex-biased dispersal in the vector of Lyme disease *Ixodes ricinus* // Evolution. - 2002. - V. 591. - P. 1802-1807.
- 60.De Nova-Ocampo M., Villegas-Sepulveda N., del Angel R.M. Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA // Virology. - 2002. - V. 295. - №2. - P. 337-347. doi: 10.1006/viro.2002.1407.
- 61.Deviatkin A.A., Kholodilov I.S., Vakulenko Y.A., Karganova G.G., Lukashov A.N. Tick-Borne Encephalitis Virus: An Emerging Ancient Zoonosis? // Viruses. – 2020. - V.12. – P. 247; doi:10.3390/v12020247.
- 62.Dobler G., Gniel D., Petermann R., Pfeffer M. Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis // Wien Med Wochenschr. – 2012. – V. 162. - №11-12. – P.230-238. doi: 10.1007/s10354-012-0100-5.
- 63.Dobler G., Erber W., Broker M., Schmitt H.J. The TBE-book. 2nd ed. Singapore: Global Health Press; 2019. doi: 10.33442/978-981-14-0914.
- 64.Dobler G., Tkachev S. Chapter 11. General epidemiology of TBE. In: Dobler G., Erber W., Broker M., Schmitt H.J. eds. The TBE-book. 2nd ed. Singapore: Global Health Press. 2019b. P. 192-211. doi: 10.33442/978-981-14-0914-1_11.
- 65.Dokland T., Walsh M., Mackenzie J.M., et al. West Nile virus core protein: tetramer structure and ribbon formation // Structure. – 2004. - V. 12. - №7. - P. 1157-1163. doi: 10.1016/j.str.2004.04.024.

- 66.Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia // J. Gen. Virol. – 1999. – V. 80. - №1. – P. 179-185. doi: 10.1099/0022-1317-80-1-179.
- 67.Egyed L., Zsuzsanna Rónai Z., Dán A. Hungarian tick-borne encephalitis viruses isolated from a 0.5-ha focus are closely related to Finnish strains // Ticks Tick Borne Dis. - 2018. - V.9. - №5. - P.1064-1068.doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.03.032.
- 68.Elshuber S., Allison S.L., Heinz F.X., et al. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus // J. Gen. Virol. - 2003. - V. 84. - №1. - P. 183-191. doi: 10.1099/vir.0.18723-0.
- 69.Fajs L., Durmisi E., Knap N., Strle F., Avsic-Zupanc T. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia // PLoS ONE. - 2012. – V. 7. - №11. - E48420.
- 70.Falgout B., Chanock R., Lai C.J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a // J. Virol. - 1989. - V. 63. - №5. - P. 1852-1860.
- 71.Falgout B., Pethel M., Zhang Y.M., et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of Dengue virus nonstructural proteins // J. Virol. - 1991. - V. 65. -№ 5. - P. 2467-2475.
- 72.Falgout B., Markoff L. Evidence that Flavivirus NS1-NS2A Cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum // J. Virol. - 1995. - V. 69. - №11. - P. 7232-7243.
- 73.Fares W., Dachraoui K., Cherni S., Barhoumi W., Slimane T.B., Younsi H., s Zhioua E. Tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks, Tunisia // Ticks and Tick-borne Diseases. - 2021. - 12.101606.
- 74.Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., et al., editors. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, London: Elsevier Academic Press; 2005.

75. Formanova P., Cerny J., Bolfikova B.C., Valdes J.J., Kozlova I., Dzhioev Y., Ruzek D. Full genome sequences and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus strains isolated from human patients // *Ticks Tick Borne Dis.* - 2015. – V. 6. - № 1. – P. 38-46.
76. Frey S., Essbauer S., Zoller G., Klempa B., Weidmann M., Dobler G., Pfeffer M. Complete Genome Sequence of Tick-Borne Encephalitis Virus Strain A104 Isolated from a Yellow-Necked Mouse (*Apodemus flavicollis*) in Austria // *Genome Announc.* - 2013. – V. 1. - №4. - e00564-13.
77. Füzik T., Formanová P., Růžek D., et al. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody // *Nat. Commun* - 2018. V. 9. - №1. – P. 436. doi: 10.1038/s41467-018-02882-0.
78. Gäumann R., Mühlemann K., Strasser M., Beuret C.M. High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – V. 76. - №13. – P. 4241-4249. doi: 10.1128/AEM.00391-10.
79. Gäumann R., Růžek D., Mühlemann K., Strasser M., Beuret C.M. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis virus field isolates from Switzerland // *J. Med. Virol.* – 2011. – V. 83. - №5. – P. 853-863. doi: 10.1002/jmv.21993. PMID: 21412794.
80. Gould E.A., de Lamballerie X., Zanotto P.M., Holmes E.C. Evolution, epidemiology, and dispersal of flaviviruses revealed by molecular phylogenies // *Adv. Virus. Res.* – 2001. V. 57. – P. 71-103. doi: 10.1016/s0065-3527(01)57001-3/.
81. Grard G., Moureau G., Charrel R.N., Lemasson J.J., Gonzalez J.P., Gallian P., Gritsun T.S., Holmes E.C., Gould E.A., de Lamballerie X. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy // *Virology.* – 2007. V. 361. - № 1. – P. 80-92. doi: 10.1016/j.virol.2006.09.015.
82. Gritsun T.S., Frolova T.V., Pogodina V.V., Lashkevich V.A., Venugopal K., Gould E.A. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope gene

- of the Vasilchenko strain of TBE virus; comparison with other flaviviruses // *Virus Res.* - 1993. – V. 27. P. 201-209.
- 83.Gritsun T.S., Holmes E.C., Gould E.A. Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis // *Virus Research.* - 1995. – V.35. - P. 307-321.
- 84.Gritsun T.S., Venugopal K., Zanotto P.M., et al. Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs // *Virus Research.* - 1997. - V. 49. - №1. - P. 27-39. doi: 10.1016/s0168-1702(97)01451-2.
- 85.Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis // *Antivir. Res.* – 2003. – V. 57. - №1-2. - P. 129-146. doi: 10.1016/s0166-3542(02)00206-1.
- 86.Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S.L., Frolova M.P., Pogodina V.V., Lashkevich V.A., Gould E.A. Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis // *J. Virol.* - 2003. – V.77. – P. 25-36.
- 87.Gritsun T.S., Gould E.A. Origin and evolution of flavivirus 5'UTRs and panhandles: trans-terminal duplications? // *Virology.* – 2007. – V. 366. - №1. - P. 8-15. doi:10.1016/j.virol.2007.04.011.
- 88.Heinz F.X., Kunz C. Isolation of dimeric glycoprotein subunits from tick-borne encephalitis virus // *Intervirology.* - 1980. - V. 13. - №1. - P. 169-177.
- 89.Heinz F.X., Mandl C.W. The molecular biology of tick-borne encephalitis virus // *APMIS.* - 1993. - V. 101. - P. 735-745. doi: 10.1111/j.1699-0463.1993.tb00174.x.
- 90.Heinz F.X., Stiasny K., Puschner-Auer G., et al. Structural changes and functional control of tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by heterogimeric association with protein prM // *Virology.* - 1994. - V. 198. - №1. - P. 109-117. doi: 10.1006/viro.1994.1013.
- 91.Heinze D.M., Gould E.A., Forrester N.L. Revisiting the clinal concept of evolution and dispersal for the tick-borne flaviviruses by using phylogenetic

- and biogeographic analyses // *J. Virol.* – 2012. – V. 86. - №16. – P. 8663-8671. doi: 10.1128/JVI.01013-12.
92. Holding M., Dowall S., Medlock J., Carter D., McGinley L., Curran-French M., Pullan S., Chamberlain J., Hansford K., Baylis M., Vipond R., Hewson R. Detection of new endemic focus of tick-borne encephalitis virus (TBEV), Hampshire/Dorset border, England // *Euro surveillance.* – 2019. - V.24. - №47. – P. 21.
93. Holding M., Dowall S.D., Medlock J.M., Carter D.P., Pullan S.T., Lewis J., Vipond R., Rocchi M.S., Baylis M., Hewson R. Tick-Borne Encephalitis Virus, United Kingdom // *Emerg. Infect. Dis.* – 2020. – V. 26. - №1. – P. 90-96. doi: 10.3201/eid2601.191085.
94. Holzmann H., Aberle S.W., Stiasny K., Werner P., Mischak A., Zainer B., et al. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria // *Emerg. Infect. Dis.* – 2009. – V.15. – P. 1671-1673. doi: 10.3201/eid1510.090743.
95. Hubálek Z., Rudolf I. Tick-borne viruses in Europe // *Parasitol. Res.* - 2012. - V. 111. - № 1. – P. 9-36. doi: 10.1007/s00436-012-2910-1.
96. Hurrelbrink R.J., McMinn P.C. Molecular determinants of virulence: The structural and functional basis for flavivirus attenuation // *Adv. Virus Res.* – 2003. – V. 60. – P.1-42.
97. ICTV Taxonomy history: *Flaviviridae*. EC 51, Berlin, Germany, July 2019; E-mail ratification March 2020. <https://talk.ictvonline.org/>.
98. Im J.H., Baek J., Durey A., et al. Current Status of Tick-Borne Diseases in South Korea // *Vector Borne Zoonotic Dis.* - 2019. - V. 19. - №4. - P. 225-233. doi: 10.1089/vbz.2018.2298.
99. Jaaskelainen A.E., Tonteri E., Sironen T., et al. European subtype tick-borne encephalitis virus in *Ixodes persulcatus* ticks // *Emerg. Infect. Dis.* - 2011. - V. 17. - №2. - P. 323-325.
100. Jahfari S., de Vries A., Rijks J.M., Van Gucht S., Vennema H., Sprong H., et al. Tick-Borne Encephalitis Virus in Ticks and Roe Deer, the Netherlands //

- Emerg. Infect. Dis. – 2017. – V.23. – №6. – P.02830. <https://doi.org/10.3201/eid2306.161247> PMID: 28518024.
101. Jones C.T., Ma L., Burgner J.W., et al. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein // *J. Virol.* - 2003. - V. 77. - №12. - P. 7143-7149. doi: 10.1128/jvi.77.12.7143-7149.2003.
102. Kaiser R. Tick-borne encephalitis: clinical findings and prognosis in adults // *Wien Med. Wochenschr.* – 2012. – V. 162. - №11-12. – P. 239-243. doi: 10.1007/s10354-012-0105-0.
103. Khromykh A.A., Meka H., Guyatt K.J., et al. Essential role of cyclisation sequences in flavivirus RNA replication // *J. Virology.* - 2001. - V. 75. - P. 6719–6728. doi: 10.1128/JVI.75.14.6719-6728.2001.
104. Kim S.Y., Yun S.M., Han M.G., et al. Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea // *Vector Borne Zoonotic Dis.* - 2008. – V. 8. - №1. - P.7-13. doi: 10.1089/vbz.2006.0634.
105. King A.M.Q, Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press; 2012. doi: 10.1038/nrmicro.2016.177.
106. Klaus C., Hörügel U., Hoffmann B., Beer M. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: clinical and laboratory findings and epidemiological investigations // *Vet Microbiol.* – 2013. – V. 163. - №3-4. – P. 368-72. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.12.041.
107. Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Fields Virology*, 6th edition. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2013.
108. Ko S., Kang J.G., Kim S.Y., et al. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in ticks from southern Korea // *J. Vet. Sci.* - 2010. - V. 11. - P. 197-203.
109. Konishi E., Mason P.W. Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein // *J. Virol.* - 1993. - V. 67. - №3. - P. 1672-1675.

110. Kopecky J., Krivanec K., Tomkova E. Attenuated temperaturesensitive mutants of tick-borne encephalitis (TBE) virus isolated from natural focus. In: Dusbabek F, Bukya V, editors. Modern acarology. Prague and The Hague: Academia and SPD Academic Publishing. 1991. – P. 11-19.
111. Kozlova I.V., Demina T.V., Tkachev S.E., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Verkhozina M.M., Karan L.S., Dzhioev Yu.P., Paramonov A.I., Suntsova O.V., Savinova Yu.S., Chernoiivanova O.O., Ruzek D., Tikunova N.V., Zlobin V.I. Characteristics of the Baikal subtype of tick-borne encephalitis virus circulating in Eastern Siberia // *Acta Biomedica Scientifica*. - 2018. - V. 3. - № 4. - P. 53-60.
112. Kuivanen S., Smura T., Kantonen J., Kämppe L., Kantonen J., Keroet M., et al. Fatal Tick-Borne Encephalitis Virus Infections Caused by Siberian and European Subtypes, Finland, 2015 // *Emerg. Infect. Dis.* – 2018. – V. 24. - №5. – P. 946-948. doi:10.3201/eid2405.171986.
113. Kümmerer B.M., Rice C.M. Mutations in the Yellow Fever Virus Nonstructural Protein NS2A Selectively Block Production of Infectious Particles // *J. Virol.* - 2002. - V. 76. - № 10. - P. 4773–4784. doi: 10.1128/jvi.76.10.4773-4784.2002.
114. Kupca A.M., Essbauer S., Zoeller G., de Mendoca P.G., Brey R., Rinder M., Pfister K., Spiegel M., Doerrbecker B., Pfeiffer M., Dobler G. Isolation and molecular characterization of a tick-borne encephalitis virus strain from a new tick-borne encephalitis focus with severe cases in Bavaria, Germany // *Ticks Tick Borne Dis.* - 2010. – V. 1. - №1. – P. 44-51.
115. Lee J.M., Crooks A.J., Stephenson J.R. The synthesis and maturation of a non-structural extracellular antigen from tick-borne encephalitis virus and its relationship to the intracellular NS1 protein // *J. Gen. Virol.* – 1989. – V. 70. – P. 335-343.
116. Leung J.Y., Pijlman G.P., Kondratieva N., et al. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly // *J. Virol.* - 2008. - V. 82. - №10. - P. 4731-4741. doi: 10.1128/JVI.00002-08.

117. Li L., Lok S.-M., Yu I.-M., et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation // *Science*. - 2008. - V. 319, №5871. - P. 1830-1834. doi: 10.1126/science.1153263.
118. Lin R.J, Chang B.L., Yu H.P., et al. Blocking of interferon-induced jak-stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism // *J. Virol.* - 2006. - V. 80. - №12. - P. 5908-5918.
119. Lindenbach B.D., Rice C.M. Trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication // *J. Virol.* - 1997. - V. 71. - №12. - P. 9608-9617.
120. Lindenbach B.D., Rice C.M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function // *J. Virol.* - 1999. - V. 73. - № 6. - P. 4611-4621.
121. Lindquist L., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis // *Lancet*. – 2008. – V. 371. - № 9627. – P. 1861-1871. doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60800-4.
122. Liu W.J., Chen H.B., Khromykh A.A. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication // *J. Virol.* - 2003. - V. 77. - №14. - P. 7804-7813. doi: 10.1128/jvi.77.14.7804-7813.2003.
123. Liu W.J., Chen H.B., Wang X.J., et al. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription // *J. Virol.* - 2004. - V. 78. - №22. - P. 12225-12235. doi: 10.1128/JVI.78.22.12225-12235.2004.
124. Liu W.J., Wang X.J., Clark D.C., et al. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice // *J. Virol.* - 2006. - V. 80. - №5. - P. 2396-2404. doi: 10.1128/JVI.80.5.2396-2404.2006.

125. Liu L., Dong H., Chen H., et al. Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition // *Front. Biol.* - 2010. - V. 5. - №4. - P. 286–303. doi: 10.1007/s11515-010-0660-y.
126. Lommano E., Dvorak C., Vallotton L., Jenni L., Gern L. Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland // *Ticks and Tick-borne Dis.* – 2014. – V. 6. – P. 871-82.
127. Lorenz I.C., Allison S.L., Heinz F.X., et al. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum // *J. Virol.* - 2002. - V. 76. - №11. - P. 5480-5491. doi: 10.1128/jvi.76.11.5480-5491.2002.
128. Ma L., Jones C.T., Groesch T.D., et al. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2004. - V.101. - №10. - P. 3414-3419. doi: 10.1073/pnas.0305892101.
129. Mackenzie J.M., Jones M.K., Young P.R. Immunolocalization of the Dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication // *Virology.* - 1996. - V. 220. - № 1. - P. 232-240. doi: 10.1006/viro.1996.0307.
130. Mackenzie J.M., Khromykh A.A., Jones M.K., et al. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A // *Virology.* - 1998. - V. 245. - №2. - P. 203-215. doi: 10.1006/viro.1998.9156.
131. Mandl C.W., Heinz F.X., Kunz C. Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses // *Virology.* - 1988. – V. 166. - №1. – P. 197-205. doi.org/10.1016/0042-6822(88)90161.
132. Mandl C.W., Holzmann H., Meixner T., Rauscher S., Stadler P.F., Allison S.L., Heinz F.X. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. - №3. – P. 2132-2140. doi: 10.1128/JVI.72.3.2132-2140.1998.

133. Mandl C.W. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis // *Virus Res.* - 2005. – V. 111. – P. 161–174.
134. Markoff L., Falgout B., Chang A.A. Conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein // *Virology.* - 1997. - V. 233. - P. 105-117. doi: 10.1006/viro.1997.8608.
135. Mayer V., Kozuch O. Study of the virulence of tick-borne encephalitis virus. XI. Genetic heterogeneity of the virus from naturally infectious *Ixodes ricinus* ticks // *Acta Virol.* - 1969. – V. 13. P. 469–482.
136. Mazeaud C., Freppel W., Chatel-Chaix L. The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis // *Front. Genet.* - 2018. – V. 9. – P. 595. doi: 10.3389/fgene.2018.00595.
137. Mikryukova T.P., Moskvitina N.S., Kononova Y.V., Korobitsyn I.G., Kartashov M.Y., Tyuten Kov O.Y., Protopopova E.V., Romanenko V.N., Chausov E.V., Gashkov S.I., Konovalova S.N., Moskvitin S.S., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi VA, Loktev VB. Surveillance of tick-borne encephalitis virus in wild birds and ticks in Tomsk city and its suburbs (Western Siberia) // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2014. – V. 5. - №2. – P. 145-51. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.10.004.
138. Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Morozov I.V. Heterogeneity of 3'-Untranslated Region of Genome RNA of the Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) Strains Isolated from Ticks in the Western Siberia, Russia // *Int. J. of Biomed. Sci.* - 2007. - V. 3. - №3. - P. 206-210.
139. Moureau G., Cook S., Lemey P., Nougairede A., Forrester N.L., Khasnatinov M., et al. New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences // *PLoS One.* – 2015. – V. 10. - №2. doi: e0117849. doi: 10.1371/journal.pone.0117849.
140. Muñoz-Jordan J.L., Sánchez-Burgos G.G., Laurent-Rolle M., García-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100. – P. 14333-14338.

141. Muñoz-Jordan J.L., Laurent-Rolle M., Ashour J., et al. Inhibition of Alpha/Beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses // *J. Virol.* 2005. - V. 79. - №13. - P. 8004-8013. doi: 10.1128/JVI.79.13.8004-8013.2005.
142. Muylaert I.R., Chambers T.J., Galler R., et al. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence // *Virology.* - 1996. - V. 222. - №1. - P. 159-168. doi: 10.1006/viro.1996.0406.
143. Muylaert I.R., Galler R., Rice C.M. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation // *J. Virol.* - 1997. - V. 71. - №1. - P. 291-298.
144. Nosek J., Kožuch O., Grulich I. The structure of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Central Europe // *Oecologia.* – 1970. – V. 5. – P. 61-73
145. Nouredine R., Chauvin A., Plantard O. Lack of genetic structure among Eurasian populations of the tick *Ixodes ricinus* contrasts with marked divergence from north-African populations // *Inter. J. Parasitol.* - 2011. – V. 41. – P. 183-192.
146. Nowak T., Wengler G. Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus // *Virology.* - 1987. - V. 156. - №1. - P. 333-346. doi: 10.1016/0042-6822(87)90443-0.
147. O'Reilly E.K., Kao C.C. Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure // *Virology.* - 1998. - V. 252. - №2. - P. 287-303.
148. Patarapotikul J., Pothipunya S., Wanotayan R., Hongyantarachai A., Tharavanij S. Western blot analysis of antigens specifically recognized by natural immune responses of patients with Japanese encephalitis infections Southeast Asian // *J. Trop. Med. Public. Health.* – 1993. – V. 24. - №2. – P. 269-76.

149. Patkar C.G., Jones C.T., Chang Y.H., et al. Functional requirements of the yellow fever virus capsid protein // *J. Virol.* - 2007. - V. 81. - №12. - P. 6471-6481. doi: 10.1128/JVI.02120-06.
150. Perera R., Kuhn R.J. Structural Proteomics of Dengue Virus // *Curr. Opin. Microbiol.* - 2008. - V. 11. - №4. - P. 369–377. doi: 10.1016/j.mib.2008.06.004.
151. Pletnev A.G., Yamshchikov V.F., Blinov V.M. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus // *Virology.* - 1990. - V. 174. - P. 250-263. doi: 10.1016/0042-6822(90)90073-z.
152. Pogodina V.V., Savinov A.P. Variation in the pathogenicity of viruses of the tick-borne encephalitis complex for different animal species. I. Experimental infection of mice and hamsters // *Acta virologica.* – 1964. – V. 8. – P. 424 - 434.
153. Proutski V., Gould E.A., Holmes E.C. Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences // *Nucleic Acids Res.* - 1997. - V. 25. - P. 1194-1202. doi: 10.1093/nar/25.6.1194.
154. Rambaut A., Drummond A.J., Xie Dong, Baele G., Suchand M.A. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. // *Syst. Biol.* - 2018. – V. 67. - № 5/ - P. 901–904.
155. Rar V., Livanova N., Tkachev S., et al. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia // *Parasit & Vectors.* - 2017. - V.10. - №1. – P. 258.
156. Rastogi M., Sharma N., Singh S.K. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein // *Virol. J.* – 2016. – V. 13. – P. 131.
157. Rauscher S., Flamm C., Mandl C.W., et al. Secondary structure of the 3' noncoding region of flavivirus genomes: comparative analysis of base pairing probabilities // *RNA.* - 1997. - V. 3. - P. 779-791.
158. Reed L. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints / L. Reed, H.A. Muench // *Am. J. Hyg.* - 1938. - №27. - C. 493-497.

159. Romanova L., Gmyl A.P., Dzhivaniyan T.I., Bakhmutov D.V., Lukashev A.N., Gmyl L.V., Rumyantsev A.A., Burenkova L.A., Lashkevich V.A., Karganova G.G. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation // *Virology*. - 2007. – V. 362. – P. 75–84.
160. Růžek D., Stěrba J., Kopecký J., Grubhoffer L. The supposedly attenuated hy-HK variant of highly virulent Hypr strain of tick-borne encephalitis virus is obviously a strain of Langat virus // *Acta Virol.* – 2006. – V. 50. - № 4. – P. 277-278.
161. Růžek D., Gritsun T.S., Forrester N.L., et al. Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus // *Virology*. – 2008. – V. 374. – P. 249-255.
162. Růžek D., Dobler G., Donoso Mantke O. Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications // *Travel. Med. Infect. Dis.* – 2010. - V. 8. - № 4. – P. 223-32. doi: 10.1016/j.tmaid.2010.06.004.
163. Ruzek D., Avšič Županc T., Borde J., et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines // *Antiviral. Res.* - 2019. - V. 164. - P. 23-51. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.01.014.
164. Ruzek D., Yoshii K., Bloom M.E., Gould E.A. *Virology*. Chapter 2a. In: Dobler G., Erber W., Broker M., Schmitt H.J., eds. *The TBE Book*. 2nd ed. Singapore: Global Health Press; 2019. doi: 10.33442/978-981-14-0914-1_a.
165. Sakai M., Yoshii K., Sunden Y., Yokozawa K., Hirano M., Kariwa H.J. Variable region of the 3' UTR is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model // *Gen. Virol.* 2014. – V. 95. - № 4. – P. 823-835. doi: 10.1099/vir.0.060046-0.
166. Schlesinger J.J., Brandriss M.W., Putnak J.R., et al. Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody // *J. Gen. Virol.* - 1990. - V. 71. - №3. - P. 593-599.

167. Shapiro B., Rambaut A., Drummond A.J. Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences // Mol. Biol. Evol. - 2006. – V. 23. P. 7-9. doi.org/10.1093/molbev/msj021.
168. Smura T., Tonteri E., Jaaskelainen A., von Troil G., Kuivanen S., Huitu O., Kareinen L., Uusitalo J., Uusitalo R., Hannila-Handelberg T., Voutilainen L., Nikkari S., Sironen T., Sane J., Castren J., Vapalahti O. Recent establishment of tick-borne encephalitis foci with distinct viral lineages in the Helsinki area, Finland // Emerg. Microbes Infect. - 2019. – V. 8. - № 1. – P. 675-683.
169. Stadler K., Allison S.L., Schalich J., et al. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin // J. Virol. - 1997. - V. 71. - №11. - P. 8475-8481.
170. Suss J., Gelpi E., Klaus C., Bagon A., Liebler-Tenorio E.M., Budka H., Stark B., Muller W., Hotzel H. Tick-borne encephalitis in naturally exposed monkey (*Macaca sylvanus*) // Emerging Infect. Dis. - 2007. – V.13. - №6. – P. 905-907.
171. Süß J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview // Ticks Tick Borne Dis. – 2011. – V. 2. - № 1. - P. 2-15. doi: 10.1016/j.ttbdis.2010.10.007.
172. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. // Mol. Biol. Evol. - 2013. V. 30. - P. 2725-2729.
173. Thurner C., Witwer C., Hofacker I.L., Stadler P.F. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes // J. Gen. Virol. – 2004. V. 85. - № 5. – P. 1113-1124. doi: 10.1099/vir.0.19462-0.
174. Tkachev S.E., Chicherina G.S., Golovljova I., Belokopytova P.S., Tikunov A.Yu., Zadora O.V., Glupov V.V., Tikunova N.V. New genetic lineage with the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus found in Western Siberia, Russia // Infection, Genetics and Evolution. – 2017. - V. 56. – P. 36-43.

175. Umareddy I., Chao A., Sampath A., Gu F., Vasudevan S.G. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA // *J. Gen. Virol.* – 2006. – V. 87. - № 9. – P. 2605-2614. doi: 10.1099/vir.0.81844-0.
176. Uzcategui N.Y., Sironen T., Golovljova I., Jaaskelainen A.E., Valimaa H., Lundkvist A., Plyusnin A., Vaheri A., Vapalahti O. Rate of evolution and molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in Europe, including two isolations from the same focus 44 years apart // *J. Gen. Virol.* - 2012. – V. 93. - № 4. – P. 786-796.
177. Wallner G., Mandl C.W., Kunz C., et al. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus // *Virology.* - 1995. - V. 213. - №1. P. 169-178. doi: 10.1006/viro.1995.1557.
178. Wallner G., Mandl C.W., Ecker M., Holzmann H., Stiasny K., Kunz C., Heinz F.X. Characterization and complete genome sequences of high- and low-virulence variants of tick-borne encephalitis virus // *J. Gen. Virol.* - 1996. – V. 77. - №5. – P. 1035-1042.
179. Weidmann M., Frey S., Freire C.C., et al. Molecular phylogeography of tick-borne encephalitis virus in central Europe // *J. Gen. Virol.* – 2013. – V. 94. - №9. – P. 2129-2139. doi: 10.1099/vir.0.054478-0.
180. Wengler G., Wengler G., Nowak T., et al. Analysis of the influence of proteolytic cleavage on the structural organization of the surface of the West Nile flavivirus leads to the isolation of a protease-resistant E protein oligomer from the viral surface // *Virology.* - 1987. - V. 160. - №1. - P. 210-219. doi: 10.1016/0042-6822(87)90062-6.
181. Wengler G., Wengler G. Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+prM protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release // *J. Virol.* - 1989. - V. 63. - №6. - P. 2521-2526.

182. Werme K., Wigerius M., Johansson M. Tick-borne encephalitis Virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signaling // *Cell. Microbiol.* - 2008. - V. 10. - №3. - P. 696-712.
183. Westaway E.O., Mackenzie J.M., Kenney M.T., et al. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures // *J. Virol.* - 1997. - V. 71. - №9. - P. 6650-6661.
184. Whitby, J.E., Jennings, A.D., Barrett A.D. Nucleotidesequence of the envelope protein gene of the tick-borne flavivirus, Kumlinge A52 // *Virus Genes.* - 1993. – V. 7. – P. 145–149.
185. Winkler G., Maxwell S.E., Ruemmler Ch., et al. Newly synthesized Dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization // *Virology.* - 1989. - V. 171. - №1. - P. 302-305. doi: 10.1016/0042-6822(89)90544-8.
186. Wojcik-Fatla A., Cisak E., Zajac V., Zwolinski J., Dutkiewicz J. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from the Lublin region (eastern Poland) // *Ticks Tick Borne Dis.* - 2011. – V. 2. - №1. - P.16-19. doi: 10.1016/j.ttbdis.2010.10.001.
187. Yun S.M., Kim S.Y., Han M.G., Jeong Y.E., Yong T-S, Leet C-H, et al. Analysis of the envelope (E) protein gene of tick-borne encephalitis viruses isolated in South Korea // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2009 – V. 9. - №3. – P. 287–293. doi:10.1089/vbz.2008.0085.
188. Yun S.M., Kim S.Y., Ju Y.R., Han M.G., Jeong Y.E., Ryou J. First complete genomic characterization of two tick-borne encephalitis virus isolates obtained from wild rodents in South Korea // *Virus Genes.* - 2011. – V. 42. – P. 307–316. doi:10.1007/s11262-011-0575-y.
189. Yun S.M., Song B.G., Choi W., et al. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in ixodid ticks collected from the republic of Korea during 2011-2012 // *Osong Public Health Res Perspect.* - 2012. - V. 3. - P. 213-221.

190. Yurchenko O.O., Dubina D.O., Vynograd N.O., et al. Partial Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus Isolates from Ticks of Southern Ukraine // Vector Borne Zoonotic Dis. - 2017. - V.17. - №8. - P. 550-557.
191. Zajkowska J., Czupryna P. Tick-borne encephalitis—epidemiology, pathogenesis and clinical course, prophylaxis and treatment // Forum Zakażeń. - 2013. - V. 4. - №1. - P.43-51.
192. Zanotto P.M., Gao G.F., Gritsun T., Marin P.S., Jiang W.R., Venugopal K.P. et al. An arbovirus cline across the northern hemisphere // Virology. - 1995; V. 210. - №1. – P. 152-159.doi:10.1006/viro.1995.1326.
193. Zhang X., Ge P., Yu X., et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution // Nat. Struct. Mol. Biol. - 2013. - V. 20. - №1. - P. 105-110. doi: 10.1038/nsmb.2463.
194. Электронный ресурс: <https://talk.ictvonline.org/> (дата обращения 20.05.21)
195. Электронный ресурс: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (дата обращения 20.01.21)
196. Электронный ресурс: <http://www.viprbrc.org/>(дата обращения 10.01.21)