

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-55>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Биологические свойства и филогенетические связи изолятов вируса клещевого энцефалита (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) сибирского субтипа, выделенных на юге Восточной Сибири в современный период

Мельникова О.В.¹, Адельшин Р.В.^{1,2}, Лопатовская К.В.¹, Трушина Ю.Н.¹, Яковчиц Н.В.¹, Андаев Е.И.¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 664047, Иркутск, Россия; ²ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», 664003, Иркутск, Россия

Введение. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) – важнейший с медицинской точки зрения представитель одноимённой серогруппы рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. По мнению разных исследователей, существует от 3 до 5 субтипов ВКЭ, самым распространённым из которых является сибирский.

Цель работы – сравнение биологических свойств и выявление филогенетических связей большой группы изолятов ВКЭ сибирского субтипа, циркулирующего в природных очагах юга Восточной Сибири в современный период (2006–2019 гг.).

Материал и методы. Иксодовых клещей (*Ixodidae*) и мелких млекопитающих (*Mammalia*) из природных очагов клещевого энцефалита (КЭ) Иркутской области, Республики Бурятия и Республики Тыва, а также материал от пациентов исследовали на маркеры ВКЭ в иммуноферментном анализе (ИФА) и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Из суспензий, показавших положительные результаты, изолировали вирус и изучали его патогенность для белых мышей (*Mus*) (БМ) при разных путях введения. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *E* изолятов проводили на уровне 1 пассажа. Филогенетическое дерево строили в программе MEGA X.

Результаты. Филогенетический анализ показал, что в природных очагах на исследуемой территории циркулирует ВКЭ сибирского субтипа 2 генетических линий – «Васильченко» и «Заусаев» – со значительным преобладанием первой. Выявлены различия между группами штаммов разных линий по биологическим свойствам. Большинство штаммов обеих групп оказались высоковирулентными для БМ как при внутримозговом, так и при периферическом путях введения инфекционного агента. Пониженную нейроинвазивность продемонстрировали лишь 4 штамма. Вместе с тем филогенетический анализ последовательностей гена *E* установил наличие связи штаммов с местом их изоляции, но не с хозяином или патогенностью для БМ.

Заключение. Дальнейшие работы по поиску участков генома ВКЭ, ассоциированных с патогенностью, требуют определения и изучения полногеномных последовательностей репрезентативной группы штаммов, обладающих разными биологическими свойствами.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; субтип; группы «Заусаев», «Васильченко»; вирулентность; филогенетический анализ

Для цитирования: Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Лопатовская К.В., Трушина Ю.Н., Яковчиц Н.В., Андаев Е.И. Биологические свойства и филогенетические связи изолятов вируса клещевого энцефалита (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) сибирского субтипа, выделенных на юге Восточной Сибири в современный период. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(4): 310-321. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-55>

Для корреспонденции: Мельникова Ольга Витальевна, д-р биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых вирусных инфекций, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 664047, Иркутск, Россия.
E-mail: melnikovaovit@gmail.com

Участие авторов: Мельникова О.В. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Адельшин Р.В. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Лопатовская К.В. – проведение экспериментов; Трушина Ю.Н. – проведение экспериментов; Яковчиц Н.В. – проведение экспериментов; Андаев Е.И. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счет Государственного бюджета.

Благодарности. Авторы выражают признательность всем сотрудникам лаборатории природно-очаговых инфекций и зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, а также сотрудникам ФГБУН «Институт географии им. В.Б. Сочавы» Сибирского отделения Российской академии наук (ИГ СО РАН) (Иркутск) научному сотруднику лаборатории теоретической географии, кандидату географических наук Н.Е. Красноштановой и старшему научному сотруднику той же лаборатории, кандидату географических наук С.И. Лесных, в разные годы принимавшим участие в сборе материалов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации (Протокол № 1 от 01.04.2021).

Поступила 13.04.2021

Принята в печать 14.07.2021

Опубликована 31.08.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-55>

Biological properties and phylogenetic relationships of tick-borne encephalitis virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) isolates of siberian subtype isolated in the south of East siberia in modern period

Ol'ga V. Mel'nikova¹, Renat V. Adel'shin^{1,2}, Kristina V. Lopatovskaya¹, Yulia T. Trushina¹, Nikolai V. Yakovchits¹, Evgeny I. Andaev¹

¹FSHI «Irkutsk Anti-plague Research Institute of Siberia and Far East» of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 664047, Irkutsk, Russia;

²FSBEI HE «Irkutsk State University», 664003, Irkutsk, Russia

Introduction. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is medically most important representative of the same-name serogroup of genus *Flavivirus* (*Flaviviridae*). In the view of various researchers there are 3 to 5 TBEV subtypes, of them siberian being the most prevalent. The aim of the work is to compare the biological properties and to reveal phylogenetic relationships of large group of modern (2006–2019) TBEV isolates of siberian subtype from natural foci in southern East Siberia.

Material and methods. Ixodid ticks (*Ixodidae*) and small mammals (*Mammalia*) from tick-borne encephalitis (TBE) natural foci in Irkutsk Region, Republic of Buryatia and Republic of Tuva, as well as specimens from TBE patients, were examined for TBEV markers using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Virus was isolated from suspensions with positive result, and its pathogenicity for white mice (*Mus*) (WM) was studied by different inoculation ways. Analysis of the nucleotide sequences of E gene was performed for isolates at 1st passage. Phylogenetic tree was constructed using MEGA X program.

Results. The phylogenetic analysis has shown that TBEV of siberian subtype that circulates in natural foci of the studied territory belong to two genetic lines. These lines are «Vasilchenko» and «Zausaev» with a strong predominance of the first. The differences in biological properties between the two groups of strains have been demonstrated. Most of the strains from both groups showed high virulence for WM both after intracerebral and subcutaneous inoculation. Only four strains demonstrated the reduced ability to overcome the blood-brain barrier. However, the analysis of the E protein coding sequences revealed evident correlation between phylogenetic clustering and geographical origin of isolates, but not with TBE host or pathogenicity for WM.

Conclusion. Further search for TBE genome regions associated with pathogenicity require the analysis of complete genome sequences of representative group of strains with different biological properties.

Key words: tick-borne encephalitis virus; subtype; «Zausaev», «Vasilchenko» groups; virulence; phylogenetic analysis

For citation: Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Lopatovskaya K.V., Trushina Yu.N., Yakovchits N.V., Andaev E.I. Biological properties and phylogenetic relationships of tick-borne encephalitis virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) isolates of siberian subtype isolated in the south of East Siberia in modern period. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 310-321 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-55>

For correspondence: Ol'ga V. Mel'nikova, D.Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Laboratory of Natural-Foci Viral Infections, FSHI «Irkutsk Anti-plague Research Institute of Siberia and Far East» of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 664047, Irkutsk, Russia. E-mail: melnikovao-vit@gmail.com

Information about the authors:

Mel'nikova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-5133-0323>

Adel'shin R.V., <https://orcid.org/0000-0003-3690-3992>

Lopatovskaya K.V., <https://orcid.org/0000-0002-8772-5842>

Trushina Yu.N., <https://orcid.org/0000-0003-4501-146X>

Yakovchits N.V., <https://orcid.org/0000-0002-9994-0371>

Andaev E.I., <https://orcid.org/0000-0002-6612-479X>

Contribution: Mel'nikova O.V. – the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Adel'shin R.V. – the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Lopatovskaya K.V. – conducting of the experiments; Trushina Yu.N. – conducting of the experiments; Yakovchits N.V. – conducting of the experiments; Andaev E.I. – final approval of the article for publication.

Funding. The research was funded by the State budget.

Acknowledgement. The authors are grateful to the scientists working in the Laboratory of Natural Foci Infections and Department of Zoology and Parasitology of the FSHI «Irkutsk Anti-plague Research Institute of Siberia and Far East» of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), and the scientists of the «V.B. Sochava Institute of Geography» Siberian Branch of RAS (Irkutsk), Researcher of the Laboratory of Theoretical Geography, Ph.D. (Geogr.) N.E. Krasnoshtanova and Senior Researcher of the same laboratory, Ph.D. (Geogr.) S.I. Lesnykh for their help in collecting the materials in different periods.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the institution (Protocol No 1 dated 01.04.2021).

Received 13 April 2021

Accepted 14 July 2021

Published 31 August 2021

Введение

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) – важнейший с медицинской точки зрения представитель одноимённой серогруппы рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. На сегодняшний день признано существование 3 субтипов вируса – европейского (западного), дальневосточного и сибирского [1]. Некоторые исследователи предлагают выделять ещё как минимум 3 субтипа: 886-84-подобный (байкальский), 178-79 [2–4] и гималайский [5]. Из них наиболее широко распространён и разнообразен сибирский субтип, в котором выделяют 4 группы: «Заусаев», «Васильченко», «Балтийская» и «Обская» [6]. Совсем недавно к ним предложено добавить ещё одну – «Боснийскую». Показано различное географическое распространение этих линий, при этом в Западной Сибири отмечено их наибольшее разнообразие [7]. На территории Восточной Сибири зафиксирована циркуляция групп «Васильченко» и «Заусаев» [8], причём как минимум с 60-х гг. прошлого века [9].

Штамм «Васильченко» («Vasilchenko») был выделен доктором медицинских наук, профессором, многолетним руководителем лаборатории иммунологии и патогенеза клещевого энцефалита ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (Омск) Э.А. Кветковой из крови пациента со стёртой формой клещевого энцефалита (КЭ), оказавшегося серонегативным как при обследовании по поводу данного заболевания, так и при дальнейшей иммунизации живой вакциной из штамма «Еланцев» («Elangtsev») [10]. Штамм «Заусаев» («Zausaev») изолирован в ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (Москва) от умершего больного с прогрессирующим на протяжении 2 лет хроническим (КЭ), который развился после латентного периода, равного 10 годам, с момента присасывания клеща в Томской области. Т.С. Грицун и соавт. [11] показали различия между двумя этими штаммами по признакам патогенности для сирийских хомячков, цитопатогенности для клеток PS, морфологии бляшек и электрофоретическим

профилям вирусспецифических неструктурных белков и предположили, что пациент, от которого был выделен вирус «Заусаев», скончался вследствие усилившейся патогенности латентного возбудителя вслед за спонтанным мутагенезом. В Челябинской области на протяжении последнего десятилетия наблюдается изменение структуры клинических форм КЭ с увеличением доли менингеальных и очаговых форм [12]. Молекулярно-генетические исследования полученного от таких лиц материала с последующим филогенетическим анализом позволили отнести исследуемые образцы к сибирскому субтипу, группе «Заусаев». Авторы связывают патоморфоз КЭ на Южном Урале в сторону более тяжёлого течения болезни с особенностями циркулирующего в данной местности ВКЭ.

Штаммы сибирского субтипа способны вызывать весь спектр вариантов клинического течения КЭ у человека – от инаппарантных до тяжёлых очаговых форм с летальным исходом [13, 14], что может быть обусловлено в числе других факторов гетерогенностью популяции инфекционного агента по признаку вирулентности.

Цель данного исследования заключалась в сравнении биологических свойств и выявлении филогенетических связей большой группы изолятов ВКЭ сибирского субтипа, циркулирующего в природных очагах юга Восточной Сибири в современный период.

Материал и методы

Голодных имаго иксодовых клещей (*Ixodidae*), 97,7% из которых составили представители *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930, собирали на флаг с конца апреля по начало июля на протяжении 2006–2019 гг. на разных участках Прибайкалья (Иркутская область и Республика Бурятия) с длительно существующими природными очагами КЭ. Мелких млекопитающих (*Mammalia*) отлавливали ловушками типа Геро на тех же участках в июле–сентябре 2008–2014 гг. Кровь больной с диагнозом «клещевой энцефалит?» и секционный материал от погибшей пациентки с диагнозом «микст-инфекция: клещевой энцефалит, менингоэнцефалополиомиелитическая форма тяжёлого

течения, ассоциированный с клещевым боррелиозом беззрителемной формы тяжёлого течения» были направлены на исследование в референс-центр по мониторингу за клещевым вирусным энцефалитом на базе ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора из ОГБУЗ «Иркутская областная инфекционная клиническая больница» (Иркутск). Кроме того, в 2011 г. было исследовано 1450 клещей *I. persulcatus*, собранных сотрудниками Тувинской противочумной станции Роспотребнадзора (Кызыл) на территории 7 административных образований Республики Тыва.

Особей клещей ($n = 30\ 599$) исследовали индивидуально методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора реагентов ИФА ТС АГ ВКЭ («Микроген», Россия, Томск) в соответствии с инструкцией производителя. Из вещества мозга мелких млекопитающих ($n = 82$) готовили 10% суспензию на физиологическом растворе и исследовали на той же тест-системе. Положительные по результатам ИФА суспензии клещей и мозга мелких млекопитающих с 2012 г. верифицировали в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) (комплект реагентов «АмплиСенс® ТБЕВ, *B. burgdorferi* sl., *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FL») ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» (ЦНИИЭ) Роспотребнадзора (Москва). Выделение вирусной РНК из материала суспензий осуществляли при помощи набора «АмплиПрайм® РИБО-преп» (ООО «НекстБио», Россия, Москва). Обратную транскрипцию выполняли с использованием набора реагентов «РЕВЕРТА-L-100» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора). На протяжении 2018–2019 гг. ввиду нехватки тест-систем для проведения ИФА 998 клещевых суспензий дополнительно исследовали посредством ОТ-ПЦР в реальном времени (набор реагентов «АмплиСенс® ТБЕВ, *B. burgdorferi* sl., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FL»).

Из клещевых и мозговых суспензий, показавших положительный и/или сомнительный результат на наличие антигена (АГ) и РНК ВКЭ изолировали вирус на беспородных белых мышах (БМ) 2–3-дневного возраста [15] со сроком наблюдения 21 сут. Часть клещевых суспензий, отрицательных и/или сомнительных по результатам ИФА, преимущественно полученных с территорий с низкой численностью клещей (Усть-Ордынский Бурятский округ, УОБ), исследовали на микрокультуре клеток СПЭВ (SPEV) по наличию цитопатического действия (ЦПД) вируса [15] с последующим ИФА-тестированием и закреплением в пассажах на мышах.

С целью оценки нейровирулентности и периферической активности изоляты ВКЭ титровали на беспородных БМ с массой тела 6–8 г путём их внутримозгового (по 0,025 мл) и подкожного (по 0,25 мл) заражения. За животными наблюдали на протяжении 14 сут. Титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча [15]. Нейроинвазивность оценивали по индексу инвазивности (ИИ) – разности титров вируса при внутримозговом

(в/м) (mNis) и подкожном (п/к) (mNsc) заражении (Ig LD₅₀/мл) (LD₅₀ – средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы). Эксперименты на животных выполняли в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (утверждены Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации N 708н от 23.08.2010).

Для расшифровки нуклеотидных последовательностей штаммы ВКЭ брали в работу не позднее уровня 1 пассажа, поскольку геном вируса может претерпевать изменения при адаптации к лабораторным животным [16]. В 29 случаях удалось секвенировать участок гена *E* непосредственно из клещевой суспензии, в 2 случаях – из мозговой суспензии первого заражения БМ (в пассажах штаммы не закрепились).

Полученные с помощью набора реагентов ПЦР-РВ («Синтол», Россия, Москва) и праймеров [17] ПЦР-продукты гена *E* (1193 п.н., позиции 169–1361) визуализировали в 1% агарозе и затем выделяли согласно стандартной методике [18] с некоторыми модификациями. Секвенирование ПЦР-продуктов проводили, используя набор реактивов ABI Prism BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit на приборе Genetic Analyzer 3500 xL («Applied Biosystems», Japan). Анализ и выравнивание нуклеотидной последовательности осуществляли при помощи программного продукта BioEdit v.7.0.5.3 [19]. Поиск модели для построения филогенетического дерева [20] выполняли в программном обеспечении IQ-TREE (v.1.6.12) с помощью метода ModelFinder [21]. Филогенетическое дерево строили в программе MEGA X (v.10.1.2) [22]; визуализацию производили с использованием программы FigTree (Rambaut A., 2006–2014; available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Все взятые в анализ изоляты депонированы в международной базе данных GenBank; номера отражены на дереве (рис. 1).

В процессе статистической обработки результатов использовали общепринятые методы: определение *t*-критерия, критерия Манна–Уитни и коэффициента ранговой корреляции Спирмена r_s [23]. За уровень статистической значимости принимали величину $p < 0,05$ при 95% доверительном интервале. Расчёты проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007. Карта изолятов создана с использованием программного продукта ArcGIS 9.3 (ESRI, Redlands, CA, США).

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации (Протокол № 1 от 01.04.2021).

Результаты

За исследуемый период (2006–2019 гг.) из клещей, от мелких млекопитающих и больных людей удалось получить 130 изолятов ВКЭ (табл. 1). Подавляющее большинство (126 из 130) штаммов и РНК-

изолятов получено из отдельных особей клещей *I. persulcatus*, 45% которых составили самцы. География изолятов представлена на **рис. 2**. Генотипирование 97 штаммов, 2 препаратов мозговых суспензий первого заражения БМ и 29 РНК-изолятов ВКЭ показало, что 4 из них относятся к европейскому субтипу и описаны ранее [17], остальные 124 (96,9%) – к сибирскому (**табл. 2**). При этом 2 изолята генотипировать не удалось. Среди штаммов и изолятов РНК

сибирского субтипа преобладает генетическая линия «Васильченко» ($n = 97$; 78,2%); 1 штамм представляет собой микст сибирского субтипа, остальные отнесены к группе «Заусаев» ($n = 26$; 21,0%).

Нами изучены патогенные свойства штаммов ВКЭ сибирского субтипа для БМ и проведено сравнение групп штаммов генетических линий «Васильченко» ($n = 73$) и «Заусаев» ($n = 19$) по нескольким параметрам. Результаты представлены в **табл. 3**.

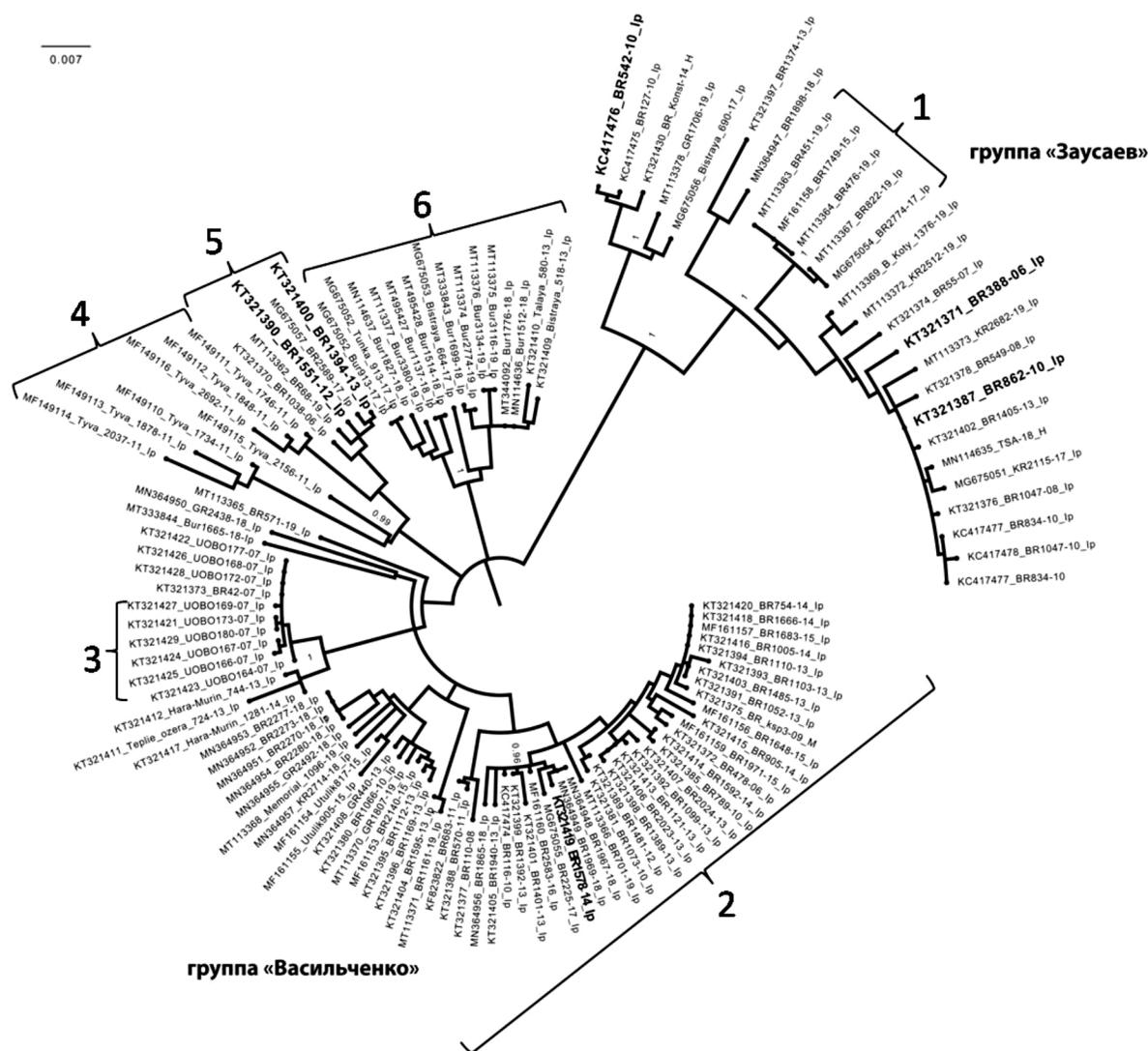


Рис. 1. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена *E* (1193 п.н.) штаммов и изолятов вируса клещевого энцефалита, выделенных на юге Восточной Сибири (модель GTR+F+I+G4).

Примечание. Условные обозначения в названиях последовательностей в зависимости от источника изоляции: Ip – *Ixodes persulcatus*, H – human, M – mouse. Указана поддержка основных узлов >0,5.

Цифрами обозначены филогенетические кластеры, связанные с местом изоляции: 1, 2, 5 – Иркутская область, Иркутский район, Байкальский тракт; 3 – Иркутская область, Усть-Ордынский Бурятский округ; 4 – Республика Тыва; 5 – Республика Бурятия.

Fig. 1. Dendrogram for the nucleotide sequences of *E* gene (1193 bp) of the tick-borne encephalitis virus isolates from Southern East Siberia territory (the GTR+F+I+G4 model).

Note. The symbols in the sequences names indicate the source of isolation: Ip, *Ixodes persulcatus*; H, human; M, mouse. Main nodes support >0.5. Numbers mark phylogenetic clusters associated with place of isolation: 1, 2, 5 – Irkutsk Region, Irkutsk district, Baikal road; 3 – Irkutsk Region, Ust'-Orda Buryat area; 4 – Republic of Tuva; 5 – Republic of Buryatia.

Таблица 1. Изоляты вируса клещевого энцефалита с территорий юга Восточной Сибири (2006–2019 гг.)

Table 1. The tick-borne encephalitis virus isolates from Southern part of East Siberia (2006–2019)

Место сбора материала Place of the material collection	Источник изоляции Isolation source	Способ изоляции Isolation technique			Всего изолятов Total isolates
		Белые мыши White mice	Культура клеток СПЭВ SPEV cell culture	ОТ-ПЦР RT-PCR	
Иркутская область, Иркутский район, Байкальский тракт Irkutsk Region, Irkutsk district, Baikal road					
17 км 17 km	Кровь больной К. (укус клеща на 17 км Байкальского тракта) Blood of the sick person K. (tick bite at 17 km of Baikal road)	1	0	0	1
23 км 23 km	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	7	0	0	7
30 км 30 km	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	2	0	0	2
43 км 43 km	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	27	1	9	37
	Красно-серая полёвка (мозг) Large-toothed redback vole (brain) <i>Clethrionomys (Myodes) rufocanus</i>	1	0	0	1
	Бурозубка (мозг) Common shrewmouse (brain) <i>Sorex</i> sp.	1	0	0	1
47 км 47 km	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	17	3	10	30
Иркутская область, Иркутский район, Бай- кальский тракт, посёлок Никола Irkutsk Region, Irkutsk district, Baikal road, Nikola village	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	1	0	0	1
Иркутский район, Мемориал Irkutsk district, Memory place	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	1	0	0	1
Иркутский район, Голоустненский тракт Irkutsk district, Goloustnensky road	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	3	0	2	5
Иркутский район, посёлок Большие Коты Irkutsk district, Bol'shie Koty village	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	1	0	0	1
Шелеховский район Shelekhovsky district	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	1	0	1	2
	Секционный материал (вещество базальных ядер головного мозга больной, погибшей от клещевого энцефалита) Sectional material (substance of the basal nuclei of the brain of a patient who died of tick-borne encephalitis)	1	0	0	1
Слюдянский район Slyudyansky district	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	6	0	6	12
Усть-Ордынский Бурятский округ Ust'-Orda Buryat area	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	0	9	0	9
Республика Бурятия, Тункинский район Republic of Buryatia, Tunkinsky district	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	11	0	1	12
Республика Тыва Republic of Tuva	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	7	0	0	7
Всего Total		88	13	29	130

Примечание. ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

Note. RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction.

На первом этапе исследования (изоляция на сосунках БМ) животные, как правило, заболели при первом заражении, за исключением 2 штаммов группы «Заусаев» и 2 – «Васильченко». Однако при инокуляции клещевых суспензий, содержащих вирус группы «Заусаев», инкубационный период оказался достоверно короче ($p < 0,01$; число степеней

свободы (degrees of freedom) $df = 79$). Это позволяет заключить, что изучаемая нами группа штаммов «Заусаев» значительно быстрее вызывает развитие инфекционного процесса у БМ по сравнению со штаммами «Васильченко». Корреляции между длительностью инкубационного периода при первичном заражении сосунков БМ и количеством АГ ВКЭ

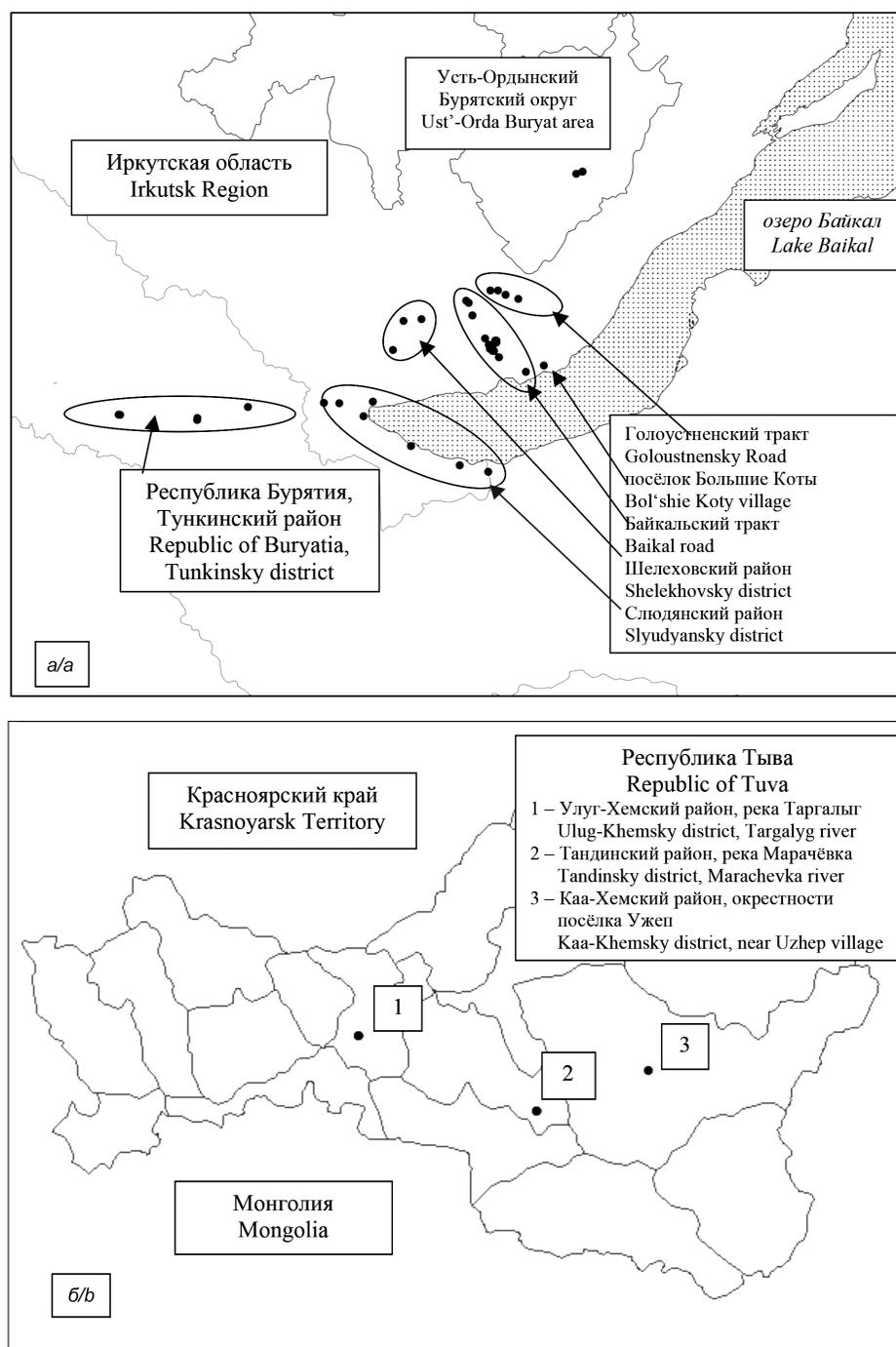


Рис. 2. Места изоляции вируса клещевого энцефалита на территории Прибайкалья (Иркутская область и Республика Бурятия) (а) и Республики Тыва (б) в 2006–2019 гг.

Fig. 2. Locations of the tick-borne encephalitis virus isolation in the territory of Baikal Region (Irkutsk Region and Republic of Buryatia) (a) and Tuva Republic (b) in 2006–2019.

Таблица 2. Генетическая принадлежность изолятов и биологические свойства групп штаммов вируса клещевого энцефалита с разных территорий Прибайкалья**Table 2. Genetic identity and biological features of strains from different areas of Baikal Region**

Место сбора материала Place of the material collection	Количество изолятов Number of isolates	Количество генотипированных образцов Number of genotyped samples		Группа сибирского субтипа Siberian subtype group		Инкубационный период при первом заражении мышей (сут) Incubation period following primary mice inoculation (days)	Церебральная активность, lg LD ₅₀ /мл Cerebral activity, lg LD ₅₀ /ml	Периферическая активность, lg LD ₅₀ /мл Peripheral activity, lg LD ₅₀ /ml	Индекс инвазивности Invasiveness index
		сибирский siberian	европейский european	«Васильченко» «Vasilchenko»	«Заусаев» «Zausaev»				
Иркутская область Irkutsk Region									
Иркутский район, Байкальский тракт Irkutsk district, Baikal road									
17 км 17 km	1	1	0	0	1	4	10,1	9,1	1,0
23 км 23 km	7	7**	0	1	5	4–7	7,0–10,9	4,8–8,3	1,0–3,0
30 км 30 km	2	2	0	2	0	5–7	7,4–10,2	6,3–6,9	1,1–3,3
43 км 43 km	39*	36	3	31	5	4–19	6,9–11,0	3,3–9,9	0,7–3,7
47 км 47 km	30*	27	1	19	8	4–15	3,6–10,98	2,4–9,3	1,2–2,8
Иркутский район, Байкальский тракт, посёлок Никола Irkutsk district, Baikal road, Nikola village	1	1	0	1	0	4	8,3	6,4	1,9
Иркутский район, Мемориал Irkutsk district, Memory place	1	1	0	1	0	4	10,3	8,9	1,4
Иркутский район, Голоустненский тракт Irkutsk district, Goloustnensky road	5	5	0	4	1	4–8	8,1–10,4	6,8–8,9	0,9–1,5
Иркутский район, посёлок Большие Коты Irkutsk district, Bol'shie Koty village	1	1	0	0	1	4–5	9,99	7,6	2,4
Шелеховский район Shelekhovsky district	3*	3	0	1	2	5–8	8,3–9,1	6,9–7,8	1,3–1,4
Слюдянский район Slyudyansky district	12*	12	0	9	3	4–15	8,1–10,4	6,9–8,3	1,1–2,9
Усть-Ордынский Бурятский округ Ust'-Orda Buryat area	9	9	0	9	0	Изоляция на культуре клеток СПЭВ Isolation on SPEV cell culture	8,1–11,5	7,1–9,3	1,0–2,4
Республика Бурятия Republic of Buryatia									
Тункинский район Tunkinsky district	12*	12	0	12	0	4–16	7,4–10,1	6,1–7,8	1,3–4,0
Республика Тыва Republic of Tuva									
Улуг-Хемский, Тандинский, Каа-Хемский районы Ulug-Khemsy, Tandinsky, Kaа-Khemsy districts	7	7	0	7	0	2–7	8,0–10,4	6,1–9,4	0,2–2,8
Всего Total	130	124	4	97	26	6	9,2	7,4	1,8

Примечание. * данные приведены с учётом изолятов РНК; ** – один штамм – сибирский mix.

Note. * the data are given including RNA-isolates; **, one strain, siberian mix.

в клещевой суспензии, измеренным по величине экстинкции в ИФА, не выявлено ($r_s = -0,105$).

Степень вирулентности штаммов оценивали по 2 показателям – среднему инфекционному титру при в/м и п/к заражении беспородных БМ массой 6–8 г. Диапазон колебаний церебральной активности штаммов составлял в группе «Заусаев» 7,0–10,9 lg LD₅₀/мл при среднем значении 9,4 ± 0,25; в группе «Васильченко» – 6,9–11,6 lg LD₅₀/мл, среднее значение – 9,3 ± 0,11. В качестве критерия при оценке указанного параметра использована медиана значений церебрального титра 8,5 lg LD₅₀/мл. Ниже этой величины церебральная активность была у 2 (10,5%) штаммов группы «Заусаев» и 15 (20,5%) – группы «Васильченко».

Подавляющее большинство исследованных штаммов обеих генетических линий были высоковирулентными (≥6 lg LD₅₀/мл) и при периферическом пути введения: в 84,2% случаев для группы «Заусаев» и в 95,9% для «Васильченко». 3 штамма линии «Заусаев» и 2 – «Васильченко» проявили умеренную вирулентность (4,1–5,9 lg LD₅₀/мл), и только 1 (из группы «Васильченко» № KT321400 в базе GenBank) оказался слабовирулентным (3,3 lg LD₅₀/мл). Следует отметить, что его церебральная активность тоже была сниженной (6,9 lg LD₅₀/мл). Диапазон колебаний периферической активности составил в группе «Заусаев» 4,5–9,1 lg LD₅₀/мл при среднем значении 7,6 ± 0,31, «Васильченко» – 3,3–9,9 lg LD₅₀/мл, среднее значение – 7,5 ± 0,13. Для характеристики периферической активности использовали ИИ, представляющий собой разность показателей lg LD₅₀/мл титров

mNis и mNsc в опыте параллельного титрования на мышах. Данный параметр количественно характеризует способность штамма достигать центральной нервной системы (ЦНС) при инокуляции вируса экстраневральным путём [24]. Принято считать, что показатель ИИ ≤2,0 свидетельствует о высоких инвазивных свойствах штамма, его способности преодолевать гематоэнцефалический барьер, достигать ЦНС и размножиться в ней; величина 2,1–2,9 рассматривается как средний уровень, а значение ИИ ≥3,0 указывает на сниженную инвазивную активность. В изучаемых нами группах «Заусаев» и «Васильченко» низкий уровень ИИ продемонстрировали соответственно 5,3 и 6,5% штаммов, средний – 15,8 и 25,8%, высокий – 78,9 и 67,8%. При этом низкий показатель ИИ всего в 3 случаях совпал с пониженной вирулентностью штаммов при п/к введении.

С целью дополнительной характеристики вирулентных свойств штаммов определяли среднюю продолжительность жизни (СПЖ) и процентную величину летальности БМ при разных путях заражения. Показатели СПЖ животных после инфицирования различными штаммами варьировали от 4 до 14 сут (срок наблюдения) в зависимости от способа введения патогена, группы вируса и разведения инокулируемой суспензии. При в/м заражении гибель особей наступала в среднем на 1–2 сут раньше, чем при периферическом. Эта разница сохраняется статистически достоверной вплоть до разведения вируса 1 × 10⁻⁹ для штаммов линии «Заусаев» ($p < 0,01$ для разведения 1 × 10⁻³, $p < 0,05$ для разведений 1 × 10⁻⁴–1 × 10⁻⁹; df от 20 до 36) и до разведе-

Таблица 3. Результаты сравнения групп штаммов «Заусаев» и «Васильченко» сибирского субтипа вируса клещевого энцефалита
Table 3. The results of comparison of tick-borne encephalitis Siberian subtype «Zausaev» and «Vasilchenko» groups of strains

Параметр сравнения Comparison criteria	«Заусаев» «Zausaev»	«Васильченко» «Vasilchenko»	p (95% доверительный интервал) p (95% confidence level)
Средняя величина экстинкции суспензии клеща с положительным результатом иммуноферментного анализа Average extinction level of tick suspensions with positive enzyme-linked immunosorbent assay results	5,1 ± 0,89	4,6 ± 0,35	>0,05
Доля (в процентах) изоляции штаммов при первичном заражении мышей Percentage of strains isolation after primary infection of mice	89,5 ± 7,04	96,8 ± 2,21	>0,05
Инкубационный период при первичном заражении мышей, сут Incubation period following primary mice inoculation (days)	5,0 ± 0,33	6,4 ± 0,30	<0,01
Средняя продолжительность жизни мышей при внутримозговом заражении высокой дозой вируса (1 × 10 ⁻³), сут Average life expectancy of mice following intracerebral inoculation with high viral dose (1 × 10 ⁻³) (days)	6,2 ± 0,13	6,4 ± 0,09	>0,05
Средняя продолжительность жизни мышей при подкожном заражении высокой дозой вируса (1 × 10 ⁻³), сут Average life expectancy of mice following subcutaneous inoculation with high viral dose (1 × 10 ⁻³) (days)	7,2 ± 0,33	8,0 ± 0,18	<0,05
Доля (в процентах) летальности при периферическом заражении мышей высокой дозой вируса (1 × 10 ⁻³) Percentage of the fatality rate following subcutaneous inoculation of mice with high viral dose (1 × 10 ⁻³)	98,0 ± 1,60	96,2 ± 1,11	>0,05
Доля (в процентах) выживших мышей при периферическом заражении низкой дозой вируса (1 × 10 ⁻⁹) Percentage of surviving mice following subcutaneous inoculation with low viral dose (1 × 10 ⁻⁹)	97,4 ± 1,83	89,7 ± 1,78	<0,01
Доля (в процентах) штаммов с высокой периферической активностью Percentage of strains with high peripheral activity	78,9 ± 9,35	67,7 ± 5,93	>0,05

ния 1×10^{-8} – для штаммов «Васильченко» ($p < 0,001$ для разведений $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-8}$; df от 96 до 144). Исключение составило разведение 1×10^{-6} группы штаммов «Заусаев», поскольку именно среди них чаще всего наблюдался «феномен зоны» [25]: мыши, заражённые супернатантом с высокой множественностью инфицирования (multiplicity of infection, MOI) ($1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-4}$), остаются здоровыми, а использование дальнейших разведений ($1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-7}$) приводит к увеличению доли летальных исходов.

СПЖ при п/к заражении штаммами группы «Заусаев» с высокой дозой вируса (разведение суспензии 1×10^{-3}) была значительно короче, чем у особей, инфицированных штаммами «Васильченко» (7,2 против 8 сут). В то же время при периферическом заражении низкой дозой (1×10^{-9}) выживало больше животных, заражённых штаммами «Заусаев» (97,4 против 89,7%; табл. 3).

В результате анализа 122 нуклеотидных последовательностей гена *E* (1193 п.н., позиции 169–1361) штаммов и изолятов РНК ВКЭ выявлено 317 переменных сайтов. Часть замен являются несинонимичными и приводят к замене аминокислот в 77 позициях из 397. Согласно байесовскому информационному критерию (Bayesian information criterion, BIC), оптимальной моделью для данной выборки нуклеотидных последовательностей является GTR+F+I+G4. Изученные штаммы и изоляты сибирского субтипа ВКЭ распались на 2 группы – «Васильченко» и «Заусаев» (рис. 1).

Объединение в кластеры внутри групп связано главным образом с географическим происхождением изолятов. Например, в группе «Васильченко» – это кластеры, в которые входят последовательности штаммов и изолятов ВКЭ из Республики Тыва (Tuva_1746-11_Ip, Tuva_1848-11_Ip, Tuva_2692-11_Ip и др.); Тункинской долины Республики Бурятия (Bur1776-18_Ip, Bur3116-19_Ip, Bur3134-19_Ip и др.) и соседних с ней долин рек Талая и Быстрая Слюдянского района Иркутской области (Talaya_580-13_Ip, Bistraya_518-13_Ip, Bistraya_664-17_Ip); Усть-Ордынского Бурятского округа (UOBO164-07_Ip, UOBO166-07_Ip, UOBO180-07_Ip и др.), а также кластер, в который объединяются последовательности, выделенные в Иркутском районе Иркутской области (Байкальский тракт – BR1005-14_Ip, BR1110-13_Ip, BR1666-14_Ip и др.). Если выделение штаммов на той или иной территории происходило на протяжении многих лет, то соответствующие кластеры включают в себя изоляты с данного участка независимо от года их получения. В то же время филогенетический анализ последовательностей гена *E* не показал связи изолятов по признаку патогенности для БМ: штаммы со сниженной патогенностью как из группы «Васильченко», так и из группы «Заусаев» (на рис. 1 выделены жирным шрифтом) входят в кластеры с высокопатогенными штаммами с той же территории.

Обсуждение

Вопрос о детерминантах патогенности ВКЭ до сих пор не является однозначно решённым. Одни и те же штаммы обладают неодинаковой патогенностью для

разных видов животных [10]; штаммы, выделенные от больных людей, показывают разную степень инвазивности для лабораторных мышей [26]. Из рассматриваемой в данной работе совокупности штаммов только 2 были получены от пациентов: один от пациентки К. с лихорадочной формой заболевания (№ доступа в GBKT321430), второй – из секционного материала погибшей от КЭ больной (MN114635). Оба они принадлежат к группе «Заусаев» сибирского субтипа и демонстрируют высокую степень патогенности для мышей при двух путях введения. Между тем инкубационный период при первичном заражении сосунков БМ в первом случае составил 4 сут, а во втором – 8, и вирулентность для мышей штамма от пациентки с лёгкой формой заболевания оказалась даже несколько выше, чем от больной с летальным исходом (соответственно 10,6 и 9,1 lg LD₅₀/мл при в/м, 9,1 и 7,8 lg LD₅₀/мл – при п/к введении).

В литературе нам не встретилось работ, касающихся сравнения биологических свойств линий «Заусаев» и «Васильченко». В нашем исследовании при инокуляции клещевых суспензий, содержащих вирус группы «Заусаев», инкубационный период оказался достоверно короче, чем при заражении штаммами группы «Васильченко» ($p < 0,01$, $df = 79$). По-видимому, исследованная нами группа штаммов «Заусаев» значительно быстрее вызывает развитие инфекционного процесса КЭ у БМ по сравнению с группой «Васильченко». Этот феномен может быть обусловлен как свойствами вирусов, так и разницей в количестве вирусного агента в клещевой суспензии. Весьма вероятно, что при включении в выборку новых штаммов могут получиться другие результаты либо, напротив, увеличится достоверность уже имеющихся данных.

Гликопротеин *E* является основным белком оболочки ВКЭ и содержит штаммо-, типоспецифические, а также комплекс- и группореактивные детерминанты [27]. Филогенетический анализ по фрагменту гена *E* не показал связи вирусной нагрузки у пациентов и тяжести течения заболевания у них с положением изолята на дереве [28], равно как и с его зоологическим происхождением; в то же время кластеризация коррелировала с географией штамма [29]. Аналогично этому в нашем исследовании филогенетический анализ последовательностей данного гена продемонстрировал связь штаммов с местом их изоляции, но не с хозяином или патогенностью для БМ.

В то же время полногеномное секвенирование штаммов позволило выявить замены в генах неструктурных белков ВКЭ, вероятно, влияющие на изменение патогенности [30, 31]. По всей видимости, продолжение работы в данном направлении требует анализа полногеномных последовательностей репрезентативной группы штаммов с разной патогенностью для человека и лабораторных животных.

Заключение

Таким образом, анализ большой группы штаммов, изолированных на юге Восточной Сибири в современный период (2006–2019 гг.), показал, что

в природных очагах на данной территории циркулируют 2 генетические линии ВКЭ сибирского субтипа – «Васильченко» и «Заусаев» – со значительным преобладанием первой. Установлены различия между группами штаммов разных линий по биологическим свойствам. Исследованная нами группа штаммов «Заусаев» значительно быстрее вызвала развитие инфекционного процесса КЭ у БМ по сравнению с группой «Васильченко». СПЖ жизни мышей при п/к заражении штаммами группы «Заусаев» с высокой дозой вируса оказалась значительно короче, чем у животных, зараженных штаммами «Васильченко».

Подавляющее большинство изученных штаммов обеих генетических линий были высоковирулентными для беспородных БМ как при церебральном, так и при периферическом пути введения вируса. В то же время филогенетический анализ последовательностей гена *E* не показал связи изолятов по признаку патогенности для БМ: штаммы со сниженной патогенностью как из группы «Васильченко», так и из группы «Заусаев» (на рис. 1 выделены жирным шрифтом) входят в кластеры с высокопатогенными штаммами с той же территории вместе с РНК-изолятами, оказавшимися апатогенными для БМ.

Полученные нами сведения о молекулярно-генетических и биологических свойствах выделенных штаммов ВКЭ могут иметь как теоретическое, так и прикладное значение для комплексного мониторинга КЭ и планирования профилактических санитарно-противоэпидемических мероприятий, поскольку свойства вирусной популяции в природных очагах данного заболевания могут оказывать влияние на заболеваемость людей. В дополнение к этому данные о современной структуре популяции ВКЭ на юге Восточной Сибири вносят вклад в дальнейшее изучение некоторых аспектов эволюции вируса и вызываемой им инфекции в меняющейся экологической и эпидемиологической обстановке.

ЛИТЕРАТУРА

- Růžek D., Yoshii K., Bloom M.E., Gould E.A. Virology. Chapter 2a. In: Dobler G., Erber W., Bröker M., Schmitt H.J., eds. *The TBE Book*. Singapore: Global Health Press; 2019. https://doi.org/10.33442/978-981-14-0914-1_2a
- Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Verkhozina M.M., Kozlova I.V., Tkachev S.E., Plyusnin A., et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. *J. Med. Virol.* 2010; 82(6): 965–76. <https://doi.org/10.1002/jmv.21765>
- Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A. Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 55: 159–65. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.014>
- Adelshin R.V., Sidorova E.A., Bondaryuk A.N., Trukhina A.G., Sherbakov D.Y., White III R.A., et al. “886-84-like” tick-borne encephalitis virus strains: Intraspecific status elucidated by comparative genomics. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019; 10(5): 1168–72. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.006>
- 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; 7(1): 74. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0081-6>
- Tkachev S.E., Chicherina G.S., Golovljova I., Belokopytova P.S., Tikunov A.Y., Zadora O.V., et al. New genetic lineage within the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus found in Western Siberia, Russia. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 56: 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.020>
- Tkachev S.E., Babkin I.V., Chicherina G.S., Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Demina T.V., et al. Genetic diversity and geographical distribution of the Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(2): 101327. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019>
- Карань Л.С., Погодина В.В., Колясникова Н.М., Левина Л.С., Герасимов С.Г., Маленко Г.В., и др. Сибирский подтип вируса клещевого энцефалита, доминирующий на территории России. Генетические кластеры. *Медицинская вирусология*. 2013; 27(1): 87.
- Сидорова Е.А., Адельшин Р.В., Мельникова О.В., Борисова Т.И., Андаев Е.И. Анализ полипротеина штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных в 60-х годах XX века и в современный период на территории Забайкалья и Прибайкалья. В кн.: Покровский В.И., ред. *Молекулярная диагностика. Сборник трудов. Том 2*. Тамбов: Юлис; 2017: 207–8.
- Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. *Хронический клещевой энцефалит. Этиология, иммунология, патогенез*. Новосибирск: Наука; 1986.
- Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S.L., Frolova M.P., et al. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J. Virol.* 2003; 77(1): 25–36. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.1.25-36.2003>
- Конькова-Рейдман А.Б., Злобин В.И. Патоморфоз клещевого энцефалита на Южном Урале: современное состояние проблемы. *Инфекционные болезни*. 2016; 14(S1): 141.
- Погодина В.В., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Левина Л.С., Маленко Г.В., Гамова Е.Г., и др. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(5): 16–21.
- Козлова И.В., Верхозина М.М., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., Карань Л.С., Ткачев С.Е., и др. Результаты генотипирования штаммов и изолятов РНК вируса клещевого энцефалита, выделенных от больных людей в Иркутской области и Республике Бурятия. В кн.: Покровский В.И., ред. *Молекулярная диагностика. Том 1*. М.: МБА; 2014; (1): 520–1.
- Мейхи Б., ред. *Вирусология. Методы*. Пер. с англ. Москва: Мир; 1988.
- Якименко В.В., Дрокин Д.А., Калмин О.Б., Богданов И.И., Иванов Д.И. К вопросу о влиянии host-эффекта на штаммовую изменчивость вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1996; 41(3): 112–7.
- Adelshin R.V., Melnikova O.V., Karan L.S., Andaev E.I., Balakhonov S.V. Complete genome sequences of four European subtype strains of tick-borne encephalitis virus from Eastern Siberia, Russia. *Genome Announc.* 2015; 3(3): e00609–15. <https://doi.org/10.1128/genomea.00609-15>
- Маниагис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. Пер. с англ. Москва: Мир; 1984.
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; (41): 95–8.
- Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermiin L.S. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*. 2017; 14(6): 587–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1): 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Закс Л. *Статистическое оценивание*. Пер. с нем. Москва: Статистика; 1976.
- 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 Virol.* 1964; 8: 424–34.
- Леонова Г.Н., Мураткина С.М., Кругляк С.П. Изучение вирулентности штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных на юге советского Дальнего Востока. *Вопросы вирусологии*. 1990; 35(5): 399–401.
- Kurhade C., Schreier S., Lee Y.P., Zegenhagen L., Hjertqvist M., Dobler G., et al. Correlation of severity of human tick-borne encephalitis virus disease and pathogenicity in mice. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(9): 1709–12. <https://doi.org/10.3201/eid2409.171825>
- Злобин В.И., Горин О.З. *Клещевой энцефалит: Этиология, Эпидемиология и профилактика в Сибири*. Новосибирск: Наука; 1996.

28. Saksida A., Jakopin N., Jelovšek M., Knap N., Fajs L., Lusa L., et al. Virus RNA load in patients with tick-borne encephalitis, Slovenia. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(7): 1315–23. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2407.180059>
29. Fajs L., Durmišič E., Knap N., Strle F., Avšič-Županc T. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia. *PLoS One.* 2012; 7(11): e48420. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048420>
30. 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; 9(4): e94946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094946>
31. Muto M., Bazartseren B., Tsevel B., Dashzevge E., Yoshii K., Kariwa H. Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes persulcatus* in Mongolia in 2012. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6(5): 623–9. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.05.006>

REFERENCES

1. Růžek D., Yoshii K., Bloom M.E., Gould E.A. Virology. Chapter 2a. In: Dobler G., Erber W., Bröker M., Schmitt H.J., eds. *The TBE Book*. Singapore: Global Health Press; 2019. https://doi.org/10.33442/978-981-14-0914-1_2a
2. Demina T.V., Dzhiyev Yu.P., Verkhozina M.M., Kozlova I.V., Tkachev S.E., Plyusnin A., et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. *J. Med. Virol.* 2010; 82(6): 965–76. <https://doi.org/10.1002/jmv.21765>
3. Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A. Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 55: 159–65. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.014>
4. Adelshin R.V., Sidorova E.A., Bondaryuk A.N., Trukhina A.G., Sherbakov D.Y., White III R.A., et al. “886-84-like” tick-borne encephalitis virus strains: Intraspecific status elucidated by comparative genomics. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019; 10(5): 1168–72. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.006>
5. 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; 7(1): 74. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0081-6>
6. Tkachev S.E., Chicherina G.S., Golovljova I., Belokopytova P.S., Tikunov A.Y., Zadora O.V., et al. New genetic lineage within the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus found in Western Siberia, Russia. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 56: 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.020>
7. Tkachev S.E., Babkin I.V., Chicherina G.S., Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Demina T.V., et al. Genetic diversity and geographical distribution of the Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(2): 101327. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.11.006>
8. Karan' L.S., Pogodina V.V., Kolyasnikova N.M., Levina L.S., Gerasimov S.G., Malenko G.V., et al. Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus, dominating on the territory of Russia. Genetic clusters [Sibirskiy podtip virusa kleshchevogo entsefalita, dominiruyushchiy na territorii Rossii. *Geneticheskie klasteri*]. *Meditsinskaya virusologiya.* 2013; 27(1): 87. (in Russian)
9. Sidorova E.A., Adel'shin R.V., Mel'nikova O.V., Borisova T.I., Andaev E.I. The polyprotein analysis of tick-borne encephalitis virus strains, isolated in 1960s and in modern period in the territory of Transbaikal and Baikal Regions. In: Pokrovskiy V.I., ed. *Molecular Diagnostics. Collection of Works. Volume 2 [Analiz poliproteina shtammov virusa kleshchevogo entsefalita, vydelenykh v 60-kh godakh XX veka i v sovremenny period na territorii Zabajkal'ya i Pribajkal'ya V kn.: Molekulyarnaya diagnostika. Sbornik trudov. Tom 2]*. Tambov: Yulis; 2017: 207–8. (in Russian)
10. Pogodina V.V., Frolova M.P., Erman B.A. *The Persistent Tick-Borne Encephalitis. Etiology, Immunology, Pathogenesis [Khronicheskii kleshchevoy entsefalit. Etiologiya, immunologiya, patogenez]*. Novosibirsk: Nauka; 1986. (in Russian)
11. Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S.L., Frolova M.P., et al. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J. Virol.* 2003; 77(1): 25–36. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.1.25-36.2003>
12. Kon'kova-Reydmann A.B., Zlobin V.I. Of Tick-borne encephalitis pathomorphosis in Southern Urals: up-to-date status [Patomorfoz kleshchevogo entsefalita na Yuzhnom Urale: sovremennoe sostoyanie problemy]. *Infektsionnye bolezni.* 2016; 14(S1): 141. (in Russian)
13. Pogodina V.V., Karan' L.S., Kolyasnikova N.M., Levina L.S., Malenko G.V., Gamova E.G., et al. The evolution of tick-borne encephalitis and the problem of pathogen's evolution [Evolutsiya kleshchevogo entsefalita i problema evolyutsii vzbudatelya]. *Voprosy virusologii.* 2007; 52(5): 16–20. (in Russian)
14. Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Karan' L.S., Tkachev S.E., et al. The results of genotyping of tick-borne encephalitis virus strains and RNA-isolates obtained from patients in Irkutsk Region and Republic of Buryatia. In: Pokrovskiy V.I., ed. *Molecular Diagnostics. Volume 1 [Rezultaty genotipirovaniya shtammov i izolyatov RNK virusa kleshchevogo entsefalita, vydelenykh ot bol'nykh lyudey v Irkutskoy oblasti i Respublike Buryatiya. V kn.: Molekulyarnaya diagnostika. Tom 1]*. Moscow: MBA; 2014: 520–1. (in Russian)
15. Mahy B.W.J. *Virology: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press; 1985.
16. Yakimenko V.V., Drokin D.A., Kalmin O.B., Bogdanov I.I., Ivanov D.I. On the question of host-effect on the tick-borne encephalitis virus strains variability. *Voprosy virusologii [K voprosu o vliyaniy host-effekta na shtammovuyu izmenchivost' virusa kleshchevogo entsefalita]*. 1996; 51(3): 112–7. (in Russian)
17. Adelshin R.V., Melnikova O.V., Karan L.S., Andaev E.I., Balakhonov S.V. Complete genome sequences of four European subtype strains of tick-borne encephalitis virus from Eastern Siberia, Russia. *Genome Announc.* 2015; 3(3): e00609–15. <https://doi.org/10.1128/genomea.00609-15>
18. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982.
19. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999; (41): 95–8.
20. Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermin L.S. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods.* 2017; 14(6): 587–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
21. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1): 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
22. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
23. Sachs L. *Statistische auswertungsmethoden*. Berlin: Springer-Verlag; 2013.
24. 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 Virol.* 1964; 8: 424–34.
25. Leonova G.N., Muratkina S.M., Kruglyak S.P. Study of tick-borne encephalitis virus strains, isolated in the South of Soviet Far East [Izuchenie virulentnosti shtammov virusa kleshchevogo entsefalita, izolirovannykh na yuge sovetskogo Dal'nego Vostoka]. *Voprosy virusologii.* 1990; 35(5): 399–401. (in Russian)
26. Kurhade C., Schreier S., Lee Y.P., Zegenhagen L., Hjertqvist M., Dobler G., et al. Correlation of severity of human tick-borne encephalitis virus disease and pathogenicity in mice. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(9): 1709–12. <https://doi.org/10.3201/eid2409.171825>
27. Zlobin V.I., Gorin O.Z. *Tick-Borne Encephalitis: Etiology, Epidemiology and Prevention in Siberia [Kleshchevoy entsefalit: Etiologiya, Epidemiologiya i profilaktika v Sibiri]*. Novosibirsk: Nauka; 1996. (in Russian)
28. Saksida A., Jakopin N., Jelovšek M., Knap N., Fajs L., Lusa L., et al. Virus RNA load in patients with tick-borne encephalitis, Slovenia. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(7): 1315–23. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2407.180059>
29. Fajs L., Durmišič E., Knap N., Strle F., Avšič-Županc T. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia. *PLoS One.* 2012; 7(11): e48420. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048420>
30. 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; 9(4): e94946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094946>
31. Muto M., Bazartseren B., Tsevel B., Dashzevge E., Yoshii K., Kariwa H. Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes persulcatus* in Mongolia in 2012. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6(5): 623–9. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.05.006>