

## ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВЫСОКО- И НИЗКОВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО СУБТИПА С ЛЕЙКОЦИТАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Г.Н. Леонова

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия

**Peculiarities of interaction of high and low virulent strains of tick-borne Encephalitis virus of the Far Eastern subtype with human blood leukocytes**

G.N. Leonova

Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.P. Somov, Vladivostok, Russia

### Резюме

В настоящей работе показан первый этап взаимодействия вируса клещевого энцефалита с клетками крови, при котором происходит отбор штаммов вируса, способных к успешной сборке вирионов.

Цель: показать *ex vivo* особенности взаимодействия разных по молекулярно-генетической структуре и по вирулентности штаммов вируса клещевого энцефалита с лейкоцитами крови человека.

Материалы и методы. Венозную кровь донора заражали *ex vivo* вирусом клещевого энцефалита, используя высоковирулентный штамм Dal'negorsk и низковирулентный штамм Primorye-437. Наблюдения за накоплением вируса в экспериментальных пробах крови проводили через 15 мин, 30 мин, 1 ч и 24 ч экспозиции. Индикация вируса, показанная разными методами лабораторной диагностики (ИФА, ПЦР, НМФА, титр инфекционного вируса), позволила выявить характерные особенности начальной стадии инфекционного процесса, вызванного этими штаммами вируса клещевого энцефалита.

Результаты. В пробах со штаммом Dal' во все сроки наблюдения выявлены одинаковые показатели детекции вирусного генома ( $Ct=25-27$ ). В ИФА антиген вируса не выявлен. Штамм P-437 показал задержку проникновения в лейкоциты, проявляя себя в ПЦР-РВ ( $Ct=15-17$ ) в равной степени, как и в контроле ( $Ct=17$ ). Одновременно показатели антигена вируса клещевого энцефалита в ИФА были положительными и снижались только через 24 ч экспозиции. Подобные результаты получены в НМФА и по титру вируса в пробах.

Заключение. Высокопатогенный штамм Dal' продемонстрировал способность быстро за 15 мин проникать в лейкоциты и, значит, в начальной стадии инфекционного процесса реализовать механизмы «ускользания» его от иммунного надзора. Низковирулентный штамм P-437, напротив, показал способность длительно находиться на поверхности лейкоцитов, проникая в них только после 24 ч экспозиции, сразу оказывая влияние непосредственно на клетки иммунной системы, что может приводить к быстрой элиминации вируса из организма.

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, высоковирулентный штамм, низковирулентный штамм, лейкоциты крови человека.

### Abstract

In this work, it was necessary to show the first stage of the interaction of the tick-borne encephalitis virus with blood cells, during which the selection of virus strains capable of successful assembly of virions occurs.

The aim of the work: to show *ex vivo* the features of interaction of strains TBEV with different molecular genetic structure and virulence with human blood leukocytes.

Materials and methods. The donor's venous blood was infected *ex vivo* with the TBEV using the highly virulent strain Dal'negorsk and the low-virulent strain Primorye-437. Virus accumulation in experimental blood samples was observed after 15 min, 30 min, 1 h, and 24 h of exposition. The indication of the virus, shown by different methods of laboratory diagnostics (ELISA, PCR, IFA, titer of the infectious virus), made it possible to identify the characteristic features of the initial stage of the infectious process caused by these strains TBEV.

Conclusion. The highly pathogenic strain Dal' has demonstrated the ability to quickly penetrate into leukocytes in 15 minutes, and, therefore, at the initial stage of the infectious process, to implement the mechanisms of its "escape" from immune supervision. The low-virulent strain P-437, on the contrary, showed the ability to stay on the surface of leukocytes for a long time, penetrating into them only after 24 hours of exposure, immediately influencing the cells of the immune system, which can lead to rapid elimination of the virus from the body.

**Key words:** tick-borne encephalitis virus (TBEV); highly virulent strain, low virulent strain, human blood leukocytes.

## Введение

Клещевой энцефалит — широко распространенная клещевая вирусная инфекция (КВЭ), до настоящего времени является актуальной проблемой на территории Евразийского континента [1, 2]. И хотя с начала XXI в. в России продолжается устойчивое снижение заболеваемости КВЭ, по данным оперативного мониторинга в 2018 г. зарегистрировано 1508 случаев болезни, которые были выявлены в 46 субъектах РФ, интенсивный показатель составил 1,03 на 100 тыс. населения [3].

Возбудителем КВЭ является РНК-содержащий вирус, принадлежащий к семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*, виду *Tick-borne encephalitis virus*. На основе молекулярно-генетических исследований в группе штаммов вируса клещевого энцефалита (КЭ) были определены три субтипа: I — дальневосточный, II — европейский и III — сибирский [4]. Используя авторский патент [5], мы создали коллекцию штаммов вируса КЭ, изолированных от больных инаппарантной и манифестными формами инфекции, то есть с известной степенью патогенности для человека. На основании полногеномного секвенирования мы показали, что на Дальнем Востоке циркулируют штаммы вируса КЭ только дальневосточного субтипа, которые подразделяются на 3 кластера (*Sofjin*-, *Senzhang*- и *Shkotovo*-подобных штаммов) [6]. Было установлено, что популяция вируса КЭ, циркулирующая здесь, в одних случаях вызывает тяжелое течение с летальными исходами, а в других случаях люди не заболевают, хотя инфицирование произошло. Кластер *Shkotovo*-подобных штаммов в большей части сформировали изоляты, выделенные из крови лиц с инаппарантной формой этой инфекции [7].

Известно, что после присасывания клеща на 1–3-й день, то есть в инкубационном периоде, наступает первая волна вирусемии, которая называется резорбтивной [8]. При встрече вируса с эукариотической клеткой первый этап их взаимодействия определяет молекулярный механизм, отбирающий штаммы вируса, способные к успешной сборке вирионов [9]. Используя данные генетического анализа природных изолятов, было показано, что мутации, связанные с различиями в патогенности штаммов, встречаются как в кодирующих, так и в некодирующих областях генома вируса КЭ [6, 10–12]. Детальный анализ расположения ключевых замен аминокислот в геномах штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа показал, что изменения в степени патогенности, определяющей тяжесть течения заболевания, с наибольшей вероятностью связаны с заменами аминокислот в капсидном белке С, белке РrМ и комплексе белков NS3/NS2В [6]. Эти белки вовлечены в процесс образования нуклеокапсида и встраивания его в мембрану

клетки для последующего отпочкования и выхода из нее. Точность согласованного действия этих белков влияет на отбор штаммов вируса, способных взаимодействовать с клеткой, репродуцироваться и инициировать развитие инфекционного процесса. В этой связи представило интерес получить дополнительные данные по встраиванию в мембрану клетки различных по молекулярно-генетической структуре и патогенности штаммов на раннем этапе инфицирования человека вирусом КЭ.

**Цель исследования** — показать *ex vivo* особенности взаимодействия разных по молекулярно-генетической структуре и по вирулентности штаммов вируса КЭ с лейкоцитами крови человека.

## Материалы и методы

В экспериментах использовали два штамма вируса КЭ дальневосточного субтипа: штамм *Dal'negorsk (Dal')* выделен из мозга умершего пациента с очаговой формой (номер в GenBank — FJ402886) и штамм *Primoeye-437 (P-437)* выделен из крови пациента с инаппарантной формой КЭ (номер в GenBank — JQ825162). Исходный титр вируса на культуре клеток СПЭВ для штамма *Dal'* составлял  $8.0 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ , для *P-437* —  $5.0 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$  [8]. В работе использовали штаммы в дозе  $4 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ .

Для эксперимента кровь донора забирали шприцом из локтевой вены, помещали в пробирки с ЭДТА. Количество лейкоцитов составляло  $4,2 \times 10^9/\text{л}$ . Предварительно была подготовлена среда RPMI 1640 (Sigma), содержащая 0,3 мг/мл глутамин (Sigma) и 80 мкг/мл гентамицин. Для каждого штамма было приготовлено по 4 пробирки, в которые разливали по 1 мл среды и 0,9 мл цельной крови. Затем во все пробирки добавляли вирус КЭ ( $4,0 \log \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ ) по 0,1 мл. Все пробы помещали в термостат при  $37^\circ\text{C}$ , контроль за содержанием вируса в экспериментальных пробах проводили через 15 мин, 30 мин, 1 ч и 24 ч. В каждый временной период собирали лейкоцитарный осадок, отмывали один раз физиологическим раствором, центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин. Осадок разводили в 0,5 мл физиологического раствора для проведения дальнейших исследований.

Индикация вируса была выполнена разными методами лабораторной диагностики: иммуноферментного анализа (ИФА), непрямого метода флюоресцирующих антител (НМФА), полимеразной цепной реакции в режиме реального времени ПЦР-РВ, титрования вируса на клеточной культуре почек эмбриона свиньи (СПЭВ).

Выявление антигена вируса КЭ в пробах проводили методом ИФА с использованием диагностического набора «ВектоВКЭ-антиген» (Вектор-Бест, Новосибирск), согласно инструкции про-

изготовителя тест-системы. В анализе использован показатель оптической плотности (ОП).

Титр вируса в экспериментальных пробах определяли по цитопатическому действию (ЦПА) зараженного монослоя клеточной культуры СПЭВ.

Метод НМФА использовали для выявления антигена непосредственно на клетках культуры СПЭВ, зараженной опытными пробами. Зараженные клетки из 3 пробирок собирали через 48 ч, затем из смеси клеток готовили слайды на предметных стеклах. Антиген вируса КЭ в клетках выявляли с помощью нанесения иммунной специфической сыворотки и в последующем — флуоресцирующих иммуноглобулинов (ФИТС) в рабочем разведении, указанном в инструкции изготовителя (Филиал «МЕДГАМАЛ», НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи). Просмотр слайдов проводили на микроскопе флуоресцентном МС-200 TF (Austria). Считали процент клеток с содержанием флуоресцирующего антигена ВКЭ по отношению к общему числу клеток в поле зрения.

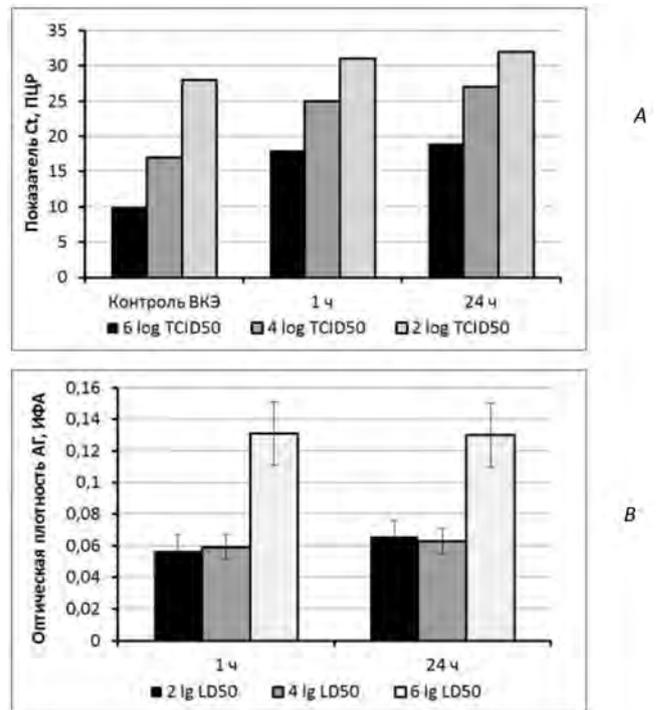
Для исследования экспериментальных проб методом ПЦР-РВ использовали набор реагентов «АмплиСенс® TBEV-F1» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Исследования проводили согласно инструкциям производителя на амплификаторе с флуоресцентной детекцией «ROTOR-GENE Q» (QIAGEN, Германия). В качестве отрицательного контроля использовали штаммы вируса КЭ (рабочая доза 4 log TCID<sub>50</sub>/мл), который содержали аналогично в условиях эксперимента.

**Результаты и обсуждение**

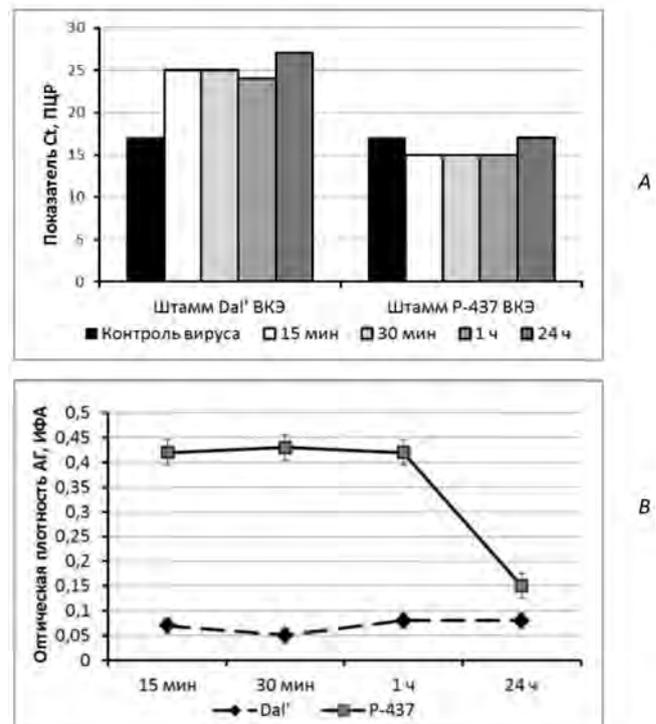
На рисунке 1 представлены результаты предварительного опыта по детекции вируса КЭ (штамм Dal'negorsk) в лейкоцитах человека спустя 1 ч и 24 ч после экспериментального заражения крови ex vivo разными дозами вируса.

Показатели ОТ-ПЦР и ИФА спустя 1 ч и 24 ч при всех заражающих дозах штамма Dal' (2, 4, 6 log TCID<sub>50</sub>) были идентичны. Это явилось основанием для предположения о том, что события инфекционного процесса, вызванного высоковирулентным штаммом вируса КЭ, развиваются более стремительно, и к 1 ч экспозиции проникновение вируса в лейкоциты крови человека уже произошло. В этой связи было принято решение провести исследования в более короткие сроки наблюдения (15 мин, 30 мин), а также повторить наблюдения спустя 1 ч и 24 ч в сравнительном плане с низковирулентным штаммом P-437. При решении этой задачи для обоих штаммов Dal' и P-437 использовали одну заражающую дозу вируса, равную 4 log TCID<sub>50</sub>.

На рисунке 2 представлены результаты детекции вируса в лейкоцитах спустя 15 мин, 30 мин, 1 ч и 24 ч после экспериментального заражения крови донора ex vivo высоковирулентным штаммом Dal'negorsk и низковирулентным штаммом Primogye-437 вируса клещевого энцефалита:



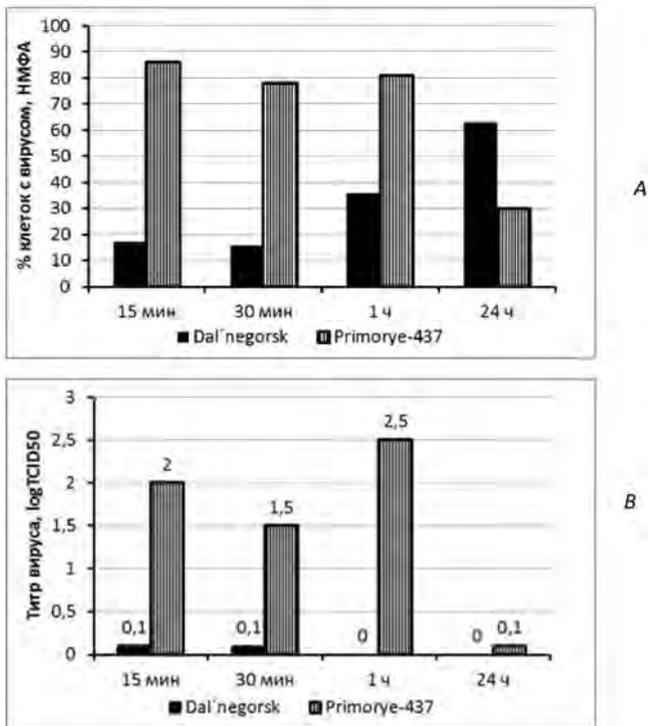
**Рис. 1.** Детекция вируса клещевого энцефалита (штамм Dal'negorsk) в лейкоцитах человека спустя 1 ч и 24 ч после экспериментального заражения крови ex vivo разными дозами вируса: А — детекция РНК в ПЦР; В — выявление антигена в ИФА



**Рис. 2.** Детекция вируса в лейкоцитах человека спустя 15 мин, 30 мин, 1 ч и 24 ч после экспериментального заражения крови донора ex vivo высоковирулентным штаммом Dal'negorsk и низковирулентным штаммом Primogye-437 вируса клещевого энцефалита: А — показатели генетического маркера (Ct) в ПЦР; В — показатели ОП антигена в ИФА

На рисунке 2 видно, что высоковирулентный штамм Dal' продемонстрировал аналогичные результаты, как и в предварительном опыте. Начиная уже с 15 мин и во все остальные сроки наблюдения, на рисунке 2А показаны одинаковые показатели детекции вирусного генома ( $Ct = 25 - 27$ ), но значительно ниже по сравнению с контролем вируса ( $Ct = 17$ ). В ИФА антиген вируса не был обнаружен (рис. 2В). Значит, высоковирулентный штамм стремительно, в первые 15 мин, проник в лейкоциты, что значительно снизило показания  $Ct$  и проявилось отсутствием антигена в ИФА. В то же время низковирулентный штамм Р-437 продемонстрировал совершенно иную картину. Во все сроки наблюдения этот штамм показал задержку его проникновения в лейкоциты, проявляя себя в ПЦР-РВ ( $Ct = 15-17$ ) в равной степени, как и в контроле ( $Ct = 17$ ). Одновременно показатель антигена КЭ в ИФА продемонстрировал также положительные результаты, которые снизились только через 24 ч (см. рис. 2).

Кроме того, зараженность экспериментальных проб штаммами вируса КЭ была дополнительно показана на клетках СПЭВ с помощью выявления антиген-положительных клеток в НМФА (рис. 3А) и определения титра вируса (рис. 3В).



**Рис. 3.** Выявление вируса КЭ (высоковирулентного штамма Dal'negorsk и низковирулентного штамма Primorye-437) в лейкоцитарных пробах зараженной крови *ex vivo* в разные сроки наблюдения: А – верификация вируса на клетках СПЭВ в НМФА; В – титр вируса в экспериментальных пробах

Пробы со штаммом Dal' продемонстрировали низкую степень специфического свечения клеток СПЭВ в ранние сроки наблюдения (15, 30 мин) с постепенным увеличением количества антиген-положительных клеток к 24 ч. Пробы со штаммом Р-437, наоборот, в ранние сроки наблюдения показали высокий процент антиген-положительных клеток СПЭВ (до 78–86%), и только к 24 ч было зафиксировано снижение количества светящихся клеток до 30%, что свидетельствовало о начавшемся процессе проникновения вируса в клетки. Эти результаты коррелировали с показателями  $Ct$  в ПЦР-РВ и ОП в ИФА (см. рис. 2А и 2В). Для получения дополнительного доказательства в экспериментальных пробах лейкоцитов зараженной крови определяли титр инфекционного вируса. Действительно штамм Dal' практически не выявляли в пробах лейкоцитов до 24 ч экспозиции, а штамм Р-437 верифицировали в ранние сроки наблюдения до  $2,5 \log TCID_{50}/мл$ . Только к 24 ч было показано снижение его титра до  $0,1 \log TCID_{50}/мл$ , что также свидетельствовало о проникновении вируса в клетки и о задержке начального этапа репликации штамма вируса КЭ, выделенного от пациента с инаппарантной формой инфекции (см. рис. 3В).

Известно, что репродукция вируса КЭ начинается в клетках места его внедрения, и из области входных ворот вирус гематогенно и лимфогенно генерализуется в различные органы и ткани [13]. По нашему мнению, важно было показать, что уже на первом этапе внедрения вируса в лейкоциты выявляются различия в ходе проникновения разных штаммов вируса КЭ, которые могут определить ход инфекционного процесса. На примере 2 разных по вирулентности и молекулярно-генетической структуре штаммов вируса КЭ показаны различия во взаимодействии их с клетками первого противoinфекционного барьера – лейкоцитами периферической крови человека. На начальном этапе инфицирования *ex vivo* лейкоцитов крови было установлено: высокопатогенный штамм Dal' продемонстрировал способность быстро, за 15 мин, проникать в лейкоциты, а значит, скрываться в эффекторных клетках иммунной системы, реализуя тем самым механизмы «ускользания» его от иммунного надзора [14]. Другой штамм Р-437, выделенный из крови пациента с инаппарантной формой КЭ, напротив, показал способность длительно находиться на поверхности лейкоцитов, проникая в клетки после 24 ч экспозиции, и тем самым непосредственно и сразу оказывать влияние на клетки иммунной системы. Свидетельством тому явились результаты, полученные в ИФА, ПЦР, НМФА и при определении титра инфекционного вируса. Следует отметить, что именно низковирулентный

штамм Р-437 вируса КЭ имеет 17 замен аминокислотных остатков и достоверно отличается от высоковирулентного штамма Dal', вызвавшего очаговую форму инфекции [6]. Такой же разновременной характер репликации разных по патогенности штаммов вируса КЭ подробно был описан нами ранее при изучении их биологической характеристики на моделях клеточной культуры СПЭВ и лабораторных животных [15, 16].

Известно, что характер иммунного ответа, в том числе при вирусных инфекциях, во многом зависит от доминирующего участия Th1- и Th2-субпопуляций лимфоцитов, которые различаются по спектру продуцируемых ими цитокинов [17]. Как было показано нами ранее [18], дисбаланс цитокинового профиля, ориентированный на Th1- или на Th2-тип иммунного ответа, был обусловлен действием разных по патогенности штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа. Выявленный дисбаланс иммунного ответа под влиянием таких штаммов, как Р-437, способствует быстрой элиминации вируса и выздоровлению пациентов или возможному развитию персистентной вирусной инфекции [19].

#### Выводы

1. Специфическая индикация вируса, выполненная разными методами лабораторной диагностики (ИФА, ПЦР, НМФА, титрование вируса), позволила выявить особенности начальной стадии инфекционного процесса, вызванного разными по патогенности штаммами вируса КЭ.

2. Показано, что заражение крови высоковирулентным штаммом Dal' ведет к быстрому (за 15 мин) проникновению вируса в лейкоциты, а низковирулентным штаммом Р-437 — к длительному выявлению вируса на поверхности лейкоцитов и проникновению его в их цитоплазму только после 24 ч.

3. Полученные результаты экспериментальных исследований *ex vivo* о характере взаимоотношений вируса с лейкоцитами крови человека в начальные сроки (до 24 ч) после заражения различающимися по вирулентности штаммами вируса КЭ дополняют представления о патогенезе клещевого энцефалита.

#### Литература

1. Suss J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia: an overview. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011; 2 (1):2–15.

2. Valarcher J.F., Hägglund S., Juremalm M., Blomqvist G., Renström L., Zohari S., Leijon M., Chirico J. Tick-borne encephalitis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 2015; 34 (2):453-466.

3. Носков, А.К. Заболеваемость клещевым вирусным энцефалитом в субъектах Российской Федерации. Сообщение 1: Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в 2018 г. и прогноз на 2019 г. / А.К. Носков

[и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. — 2019. — № 1. — С. 74–80.

4. 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;86: 8663-8671. doi: 10.1128/JVI.01013-12

5. Леонова, Г.Н. Способ выделения вирусов при инвазивных, острых и хронических формах флавивирусных инфекций / Г.Н. Леонова [и др.]. — Патент 1993 года SU1836422A3 №1836422

6. Belikov SI, Kondratov IG, Potapova UV, Leonova GN (2014) The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One.* 9(4):e94946. doi:10.1371/journal.pone.0094946

7. Леонова Г.Н., Беликов С.И. Филогенетический анализ и распространение вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа на территории Азии / Г.Н. Леонова, С.И. Беликов // Вопросы вирусологии. — 2019. — № 5 (64). — С. 250-256.

8. Иерусалимский, А.П. Клещевой энцефалит : рук-во для врачей / А.П. Иерусалимский. — Новосибирск: Гос. Мед. Академия, 2001.

9. Якименко В.В., Малькова М.Г., Тюлько Ж.С., Ткачев С.Е., Макинов М.Т., Василенко А.Г. Трансмиссивные вирусные инфекции Западной Сибири (региональные аспекты эпидемиологии, экологии возбудителей и вопросы микроэволюции) / В.В. Якименко. — Омск: Изд. центр КАН, 2019.

10. Aurélie Velay, Magali Paz, Marlène Cesbron, Pierre Gantner, Morgane Solis, Eric Soulier, Xavier Argemi, Martin Martinot, Yves Hansmann & Samira Fafi Kremer Tick-borne encephalitis virus: molecular determinants of neuropathogenesis of an emerging pathogen. *Critical Reviews in Microbiology*, 45:4, 472-493, DOI: 10.1080/1040841X.2019.1629872

11. 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; 77, 5:1035–1042.

12. Formanova, P., Cerny, J., Bolfikova, B.C., Valdes, J.J., Kozlova, I., Dzhiyev, Y., Ruzek, D. Full genome sequences and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus strains isolated from human patients. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6:38–46.

13. Морозов, Н.А. Клещевой энцефалит / Н.А., Морозов [и др.] // Инфекционные болезни. — 2014. — № 4 — С. 13–22.

14. Букринская, А.Г. Молекулярные основы патогенности вирусов / А.Г. Букринская, В.М. Жданов. — М.: Медицина, 1991.

15. Leonova, GN, Belikov, SI, Kondratov, IG, Takashima, I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology.* 2013; 443: 89–98.

16. Leonova GN, Maistrovskaya OS, Kondratov IG, Takashima I, Belikov SI. The nature of replication of tick-borne encephalitis virus strains isolated from residents of the Russian Far East with inapparent and clinical forms of infection. *Virus Res.* 2014; 189:34-42.

17. Кетлинский, С.А. Роль Т-хелперов типов 1 и 2 в регуляции клеточного и гуморального иммунитета / С.А. Кетлинский // Иммунология. — 2002. — № 2. — С. 77–79.

18. Крылова, Н.В. Динамика цитокинов при антигенемии вируса клещевого энцефалита у лиц после укуса клеща / Н.В. Крылова, Г.Н. Леонова, Е.В. Павленко // Цитокины и воспаление. — 2008. — № 1 (7). — С. 35–39.

19. Pellegrini P., Contasta I., Berghella A.M. et al. The Th1 and Th2 cytokine network in healthy subjects: suggestions for

experimental studies to create prognostic and diagnostic indices for biotherapeutic treatments. *Cancer Biother. Radiopharmaceut.* 2000; 15: 267-278.

#### References

1. Suss J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia: an overview. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011; 2 (1):2–15.
2. Valarcher J.F., Hgglund S., Juremalm M., Blomqvist G., Renström L., Zohari S., Leijon M., Chirico J. Tick-borne encephalitis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 2015; 34 (2):453-466.
3. Noskov A.K., Andaev E.I., Nikitin A.Ya., Pakskina N.D., Yatsmenko E.V., Verigina E.V., Tolmacheva M.I., Balakhonov S.V. Tick-Borne Viral Encephalitis Morbidity Rates in the Constituent Entities of the Russian Federation. Communication 1: Epidemiological Situation on Tick-Borne Viral Encephalitis in 2018 and Forecast for 2019. *Problemy osobo opasnyh infekcij.* 2019; 1:74-80. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-74-80 (in Russian)
4. 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; 86: 8663-8671. doi: 10.1128/JVI.01013-12
5. Leonova G.N., Kruglyak S.P., Lyubimova N.B., Maistrovskaya O.S., Muratkina S.M. Method of virus isolation in case of inapparent, acute and chronic forms of flavivirus infections. 1993 patent SU1836422A3 No.1836422
6. Belikov SI, Kondratov IG, Potapova UV, Leonova GN (2014) The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One.* 9(4):e94946. doi:10.1371/journal.pone.0094946.
7. Leonova G.N., Belikov S.I. Phylogenetic analysis and distribution of the tick-borne encephalitis virus of the Far Eastern subtype in Asia. *Voprosy virusologii.* 2019; 5. 64. 5: 250-256. DOI: 10.36233 / 0507-4088-2019-64-5-250-256 (in Russian)
8. Jerusalem A.P. Tick-borne encephalitis: Ruk-vo dlya vrachej. Novosibirsk: State. 2001: Honey. Academy. (in Russian)
9. Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tyulko Zh.S., Tkachev S.E., Makenov M.T., Vasilenko A.G. Vector-borne viral infections of Western Siberia (regional aspects of epidemiology, ecology of pathogens and issues of micro-evolution). 2019; Omsk: Ed. KAN Center. (in Russian)
10. Aurélie Velay, Magali Paz, Marlène Cesbron, Pierre Gantner, Morgane Solis, Eric Soulier, Xavier Argemi, Martin Martinot, Yves Hansmann & Samira Fafi Kremer Tick-borne encephalitis virus: molecular determinants of neuropathogenesis of an emerging pathogen. *Critical Reviews in Microbiology,* 45:4, 472-493, DOI: 10.1080/1040841X.2019.1629872
11. 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; 77. 5:1035–1042.
12. 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; 6:38–46.
13. Morozov N.A., Koshuba E.A., Orlov M.D., Kryuchkov M.Ya., Beltikova A.A. Tick-borne encephalitis. *Infekcionny`e bolezni.* 2014; 4: 13-22. (in Russian)
14. Bukrinskaya A.G., Zhdanov V.M. Molecular basis of viral pathogenicity. M., 1991; 256. (in Russian)
15. Leonova, GN, Belikov, SI, Kondratov, IG, Takashima, I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology.* 2013; 443: 89–98.
16. Leonova GN, Maystrovskaya OS, Kondratov IG, Takashima I, Belikov SI. The nature of replication of tick-borne encephalitis virus strains isolated from residents of the Russian Far East with inapparent and clinical forms of infection. *Virus Res.* 2014; 189:34-42.
17. Ketlinsky S.A. The role of T-helper types 1 and 2 in the regulation of cellular and humoral immunity. *Immunologiya,* 2002; 2: 77-79. (in Russian)
18. Krylova N.V., Leonova G.N., Pavlenko E.V. Dynamics of cytokines in tick-borne encephalitis virus antigenemia in individuals after a tick bite. *Czitokiny` i vospalenie.* 2008; 1. 7: 35-39. (in Russian)
19. Pellegrini P., Contasta I., Berghella A.M. et al. The Th1 and Th2 cytokine network in healthy subjects: suggestions for experimental studies to create prognostic and diagnostic indices for biotherapeutic treatments. *Cancer Biother. Radiopharmaceut.* 2000; 15: 267-278.

Автор:

Леонова Галина Николаевна — главный научный сотрудник лаборатории природно-очаговых инфекций Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, д.м.н, профессор; тел.: +7-966-280-28-45, e-mail: galinaleon41@gmail.com