

Характеристика вируса клещевого энцефалита европейского субтипа, циркулирующего на территории Сибири

И.В. Козлова^{1,4} (diwerhoz@rambler.ru), Т.В. Демина², С.Е. Ткачев³, Ю.С. Савинова¹, Е.К. Дорощенко¹, О.В. Лисак¹, Ю.П. Джигоев^{1,4}, О.В. Сунцова¹, М.М. Верхозина⁵, А.И. Парамонов¹, В.И. Злобин⁴, Н.В. Тикунова³, D. Ruzek^{6,7} (ruzekd@paru.cas.cz)

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск;

² Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

⁴ Иркутский государственный медицинский университет

⁵ Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области, г. Иркутск

⁶ Исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чешская Республика

⁷ Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, esk Bud jovice, Czech Republic.

Резюме

Цель исследования – получение комплексной характеристики вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) европейского субтипа, циркулирующего на территории Западной и Восточной Сибири. С помощью полногеномного секвенирования показано, что штаммы ВКЭ европейского субтипа, изолированные в Сибири, генетически сходны со штаммами из европейской части ареала и с представителями из Южной Кореи. Подтверждено, что гомология штаммов ВКЭ европейского субтипа, изолированных в разных точках ареала вируса от скандинавских стран на западе до восточных границ ареала (Южная Корея), гораздо выше, чем степень гомологии у штаммов ВКЭ дальневосточного и сибирского субтипов. Сибирская популяция ВКЭ европейского субтипа представлена двумя группами штаммов, обозначенными как восточносибирский и западносибирский варианты, которые отличаются по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B. Установлено, что штаммы ВКЭ европейского субтипа из Сибири обладают высокой нейровирулентностью, но при этом часть из них, аналогично штаммам из Европы, проявляет низкую инвазивность. Показано, что штаммы ВКЭ европейского субтипа обладают хорошими адаптивными способностями и, следовательно, могут легко приспосабливаться к циркуляции в составе разнообразных биоценозов на территории различных ландшафтно-географических зон. Установлено, что циркуляция ВКЭ европейского субтипа фиксируется на территории Сибири на протяжении более 40 лет. Подчеркнуто, что, несмотря на то, что ВКЭ европейского субтипа циркулирует на территориях, значительно различающихся по климатическим условиям, рельефу, ландшафту, характеристикам биотопов он обладает высокой степенью стабильности генома.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, европейский субтип, генетические свойства, генетическая вариабельность, фенотипические свойства

The characterization of TBEV of European subtype circulating in Siberia, Russia

I.V. Kozlova^{1,4} (diwerhoz@rambler.ru), T.V. Demina², S.E. Tkachev³, Yu.S. Savinova¹, E.K. Doroshchenko¹, O.V. Lisak¹, Yu.P. Dzhiyev^{1,4}, O.V. Suntsova¹, M.M. Verkhovina⁵, A.I. Paramonov¹, N.V. Tikunova³, V. I. Zlobin⁴, D. Ruzek^{6,7} (ruzekd@paru.cas.cz)

¹ Science Center of Family Health Problems and Human Reproduction, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State Agrarian University named by A.A. Ezhevsky, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁴ Irkutsk State Medical University of Ministry of Healthcare of Russia

⁵ Center of Hygiene and Epidemiology in the Irkutsk region, Irkutsk, Russia

⁶ Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

⁷ Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, esk Bud jovice, Czech Republic

Summary

The aim of the study was to obtain the complex characteristics of tick-borne encephalitis virus (TBEV) of European subtype circulating in Western and Eastern Siberia. Using full-genome sequencing approach it was demonstrated that TBEV strains of European subtype isolated in Siberia are genetically similar to the strains from European part of its habitat range, and with the representatives from South Korea. It was confirmed that the homology of TBEV strains of European subtype isolated in different parts of the virus habitat area from Scandinavian countries in the west to the eastern borders of the area (South Korea) is much higher than the homology level of TBEV

strains of Far Eastern and Siberian subtypes. The Siberian population of TBEV of European subtype is presented with two groups of strains called as Eastern Siberian and Western Siberian variants, which differ in the combinations of amino acid substitutions in all proteins except NS2B protein. It is found that TBEV strains of European subtype from Siberia possess high neurovirulence, but some of them, like strains from Europe, demonstrate low invasiveness. It is shown that TBEV strains of European subtype have good adaptive capacity, and therefore, can easily adapt to the circulation in various biocenoses in the territory of different landscape-geographical zones. It was found that the circulation of TBEV of European subtype is fixed in Siberia territory for over 40 years. It was emphasized that in spite of circulation of TBEV of European subtype in the significantly different areas by climatic conditions, topography, landscape, habitat characteristics it possesses a high degree of genome stability.

Key words: tick-borne encephalitis virus, European subtype, genetic properties, genetic variability, phenotypic properties

Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) является одной из наиболее распространенных природноочаговых нейроинфекций, передающихся иксодовыми клещами. Возбудителем КЭ является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), относящийся к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Ареал ВКЭ охватывает всю лесостепную зону Евразийского континента от японского острова Хоккайдо на востоке до островов Великобритании на западе. В рамках современных представлений о генетической вариабельности ВКЭ выделяют три его основных субтипа\генотипа:

1. дальневосточный;
2. европейский, или западный;
3. сибирский [1].

Каждый из субтипов вируса обладает собственным ареалом, в пределах которого отмечается его абсолютное доминирование. Кроме того, в настоящее время высказано предположение о существовании двух новых субтипов ВКЭ (штаммы группы 886 и штамм 178-79), которые циркулируют в Байкальском регионе России [2 – 4].

Зоной абсолютного доминирования ВКЭ европейского субтипа являются Центральная и Северная Европа, причем западная граница ее находится на территории Беларуси, Украины и скандинавских стран. Восточнее, на европейской территории России, Урале, в Западной и Восточной Сибири, отмечается совместная циркуляция европейского и сибирского субтипов, при этом ВКЭ европейского субтипа встречается, как правило, в минорных количествах. Восточной границей распространения этого субтипа ВКЭ является Южная Корея, где он был обнаружен сравнительно недавно [5, 6].

Восточной границей России, где выявлена циркуляция ВКЭ европейского субтипа, служит Восточная Сибирь (Иркутская область) [7].

Таким образом, ВКЭ европейского субтипа имеет обширнейший ареал – от Европы до Азии, он циркулирует в экосистемах значительно различающихся составом природных комплексов и биocenозов. В том числе эти различия касаются состава основных переносчиков и резервуарных хозяев.

В связи с этим, значительный научный интерес представляет проведение сравнительного анализа генетических и фенотипических свойств штаммов

ВКЭ европейского субтипа, изолированных в удаленных друг от друга точках ареала (территория Сибири и Европы), существенно отличающихся биocenотической структурой природных очагов.

Цель данного исследования – комплексная характеристика ВКЭ европейского субтипа, циркулирующего на территории Западной и Восточной Сибири.

Материалы и методы

Штаммы ВКЭ. Исследуемые штаммы ВКЭ были выделены в период с 1971 по 1998 гг. (табл. 1) путем внутримозгового заражения 1 – 3-дневных мышей-сосунков вирусной суспензией. После 2 – 3 пассажей на мышах, выделенные штаммы ВКЭ были лиофильно высушены и до использования хранились в холодильнике при температуре –20 °С. Перед началом исследований, штаммы были восстановлены путем внутримозгового заражения белых мышей весом 5 – 6 г.

Выделение РНК. Для выделения РНК готовили 10% суспензию мозга инфицированных ВКЭ мышей и центрифугировали ее при 1500 об/мин. в течение 15 минут. Отбирали 100 мкл суспензии и затем проводили выделение суммарных нуклеиновых кислот с помощью набора «РИБО-преп» (ИнтерЛаб-Сервис, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Амплификация ДНК. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора Reverta L-100 (Амплисенс, Россия), содержащим случайные гексаолигонуклеотиды. ПЦР (полимеразная цепная реакция) проходила в 20 мкл реакционной смеси в соответствии с инструкциями производителя (Биосан, Россия) с применением 3 мкл кДНК в качестве матрицы и парой соответствующих праймеров.

Секвенирование ДНК. Нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР, очищенных с использованием GFX колонок (Amersham Biosciences, США) были определены с использованием автоматического секвенатора ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Сборку полногеномных последовательностей ВКЭ делали с помощью программы MEGA 6.0 [8].

Анализ последовательностей ВКЭ. В настоящее время база данных GenBank содержит 132 полногеномных последовательности ВКЭ.

Таблица 1.

Сведения о штаммах вируса клещевого энцефалита, взятых в исследование

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

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

75 из них относятся к дальневосточному субтипу ВКЭ (в данной работе использовался прототипный штамм Софьин [9], и штаммы с номерами доступа в GenBank AB062064, AB062063, DQ989336, AY182009, AY217093, JE316707, JE316708, FJ997899, EU816450-EU816455, AY169390, FJ906622, GQ228395, FJ402885, FJ402886, DQ862460, HQ201303, HQ901366, HQ901367, HM859894, HM859895, GU121642, JN003205, JQ825144-JQ825164, AB753012, JX534167, KF880803-KF880805, KP844724-KP844727, KJ744034, KF951037, KP869172, KM019546, KJ914682, KJ914683, KJ739729-KJ739731, KJ755186, KC422667, KF826915, JX968560, KT001070- KT001073); 24 штамма сибирского субтипа ВКЭ (L40361, FJ968751, JN003206-JN003209, KC414090, KC422663, KJ626343, LC017691-LC017693, KM019546, KF826914, KF826916, KF823822, KP345889, AF527415, JQ429588, KJ701416, KP644245, DQ486861, GU183382, GU183384); два штамма, соответствующие двум новым предполагаемым субтипам ВКЭ (EF469661, EF469662 или KJ633033); 31 штамм, относящийся к европейскому субтипу ВКЭ. Молекулярно-генетический и филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 6.0 [8]. Дендрограммы были построены методом объединения ближайших соседей (neighbor-joining – NJ). Стабильность

построенных деревьев оценивали с помощью бутстреп-анализа с 1000 репликаций.

Изучение цитопатической активности проводили по общепринятым методикам. Титры вируса (в опытах титрования на культуре клеток СПЭВ) выявляли по цитопатическому действию (ЦПД) методом полных кумулятивов Рида и Менча, выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$ [10].

Нейроинвазивность. Для оценки нейроинвазивности определяли индекс инвазивности (ИИ) – разницу титров вируса при интрацеребральном (mNic) и подкожном (mNsc) заражении мышей, выраженную в $\lg \text{LD}_{50/\text{мл}}$ [11]. Заражали беспородных белых мышей массой 6 – 8 г введением в мозг по 0,03 мл, 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. Значение ИИ в пределах 1 – 2,5 свидетельствовало о высоких инвазивных свойствах штамма, способности преодолевать гематоэнцефалический барьер, достигать ЦНС и размножаться в ней. Значение ИИ ≥ 3 указывало на сниженную инвазивную активность штамма.

Терморезистентность (T_{50}) штаммов ВКЭ изучали по методу Э.А. Овчинниковой и др. [12] с использованием суточной культуры клеток СПЭВ, выращенной в 96-луночных планшетах в атмосфере CO_2 .

Уровень терморезистентности оценивали по индексу инактивации – разнице lg титров прогретого при 50 °С в течение 15 мин. и непрогретого (4 °С) вируса. При разнице титров $\leq 2,0$ lg штамм оценивали как T_{50+} , от 2,1 до 3,0 lg – как промежуточный, $\geq 3,1$ lg – как T_{50-} .

Rct42–признак (способность вируса к репродукции при супраоптимальной температуре). Для определения rct_{42} суточную культуру клеток СПЭВ, выращенную в 96-луночных планшетах, заражали десятикратными разведениями вирусосодержащей суспензии (с 10^{-1} до 10^{-10}). Часть клеточных культур, зараженных одним штаммом, инкубировали при 37 °С, другую часть, зараженную тем же штаммом, инкубировали при 42 °С в атмосфере CO_2 . Признак rct_{42} определяли на 6-й день после заражения и оценивали по разнице lg титров вируса при культивировании штаммов на культуре клеток СПЭВ при температуре 37 °С и 42 °С. При разнице титров $\leq 2,0$ lg штамм оценивали как rct_{42+} , от 2,1 до 3,0 lg – как промежуточный, $\geq 3,1$ lg – как rct_{42-} .

S-признак. Культуру клеток СПЭВ заражали штаммами ВКЭ, прошедшими не более 4-х пассажей через мозг белых мышей и трехкратное клонирование. Бляшки появлялись на 3 – 4-е сутки. Учет размера бляшек проводился на 5-е сутки после заражения, когда бляшки увеличивались в размере и становились более отчетливыми и прозрачными. S-признак учитывался как S^+ при диаметре бляшки (d) $\geq 2,5$ мм; S^+ – при $2,5 > d \geq 2,0$; S^- – при $2,0 > d \geq 1,0$.

Результаты и обсуждение

В ходе проведения цикла работ по исследованию генетической вариативности ВКЭ на территории Сибири нами было выявлено 13 штаммов вируса европейского субтипа (см. табл. 1). Девять штаммов были изолированы на территории Восточной Сибири. Семь из них были выделены из материала, собранного на территории Эхирит-Булагатского района Иркутской области в период, охватывающий годы с 1971 по 1984. Источниками для изоляции штаммов послужили мелкие млекопитающие (суслик длиннохвостый, полевка степная, красная полевка) и клещи *Ixodes persulcatus*. Один штамм ВКЭ европейского субтипа был изолирован от больного человека, который пострадал от присасывания инфицированного клеща на территории Иркутского района Иркутской области в 1998 году.

В исследование также было включено пять штаммов ВКЭ европейского субтипа из Западной Сибири (из коллекции Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека). Все они были изолированы из клещей *I. persulcatus*, собранных с растительности на флаг на территории Змеиногорского района Алтайского края.

Для получения генетической характеристики ВКЭ европейского субтипа, циркулирующего на территории Сибири нами были расшифрованы

полногеномные последовательности восьми штаммов. На момент проведения исследования в международной электронной базе данных GenBank имелись полногеномные последовательности 140 штаммов, из них 31 штамм ВКЭ европейского субтипа. В выборку штаммов из Сибири, кроме восьми наших штаммов, вошли четыре штамма из Восточной Сибири – *Sorex 18-10* (№ доступа GenBank KP938507), *IrkutskBR1456-09* (KP331443), *IrkutskBR1434-09* (KP331442), *IrkutskBR99-08* (KP331441) [13] и штамм 84.2 из Алтая (HM120875).

При сопоставлении полученных данных с последовательностями, имеющимися в GenBank, было установлено, что исследуемые штаммы, как и ожидалось, вошли в состав группы европейского субтипа ВКЭ (рис. 1).

При сравнении, как кодирующей области генома, так и соответствующей ей последовательности полипротеина среди групп штаммов трех основных субтипов, различия у штаммов ВКЭ европейского субтипа оказались минимальными, что свидетельствует о более высокой степени их генетической однородности, чем у штаммов дальневосточного и сибирского субтипов (табл. 2).

При этом максимальные показатели различий были между штаммами европейского субтипа из Центральной и Северной Европы, а именно – между штаммами *Hypr* (U39292) из Чешской Республики и *Mandal-2009* (KF991107) из Норвегии.

При сопоставлении вновь расшифрованных последовательностей между собой оказалось, что эти штаммы образуют две группы, соответствующие географическому положению мест их изоляции (западносибирский и восточносибирский варианты). Длина генома у штаммов западносибирского варианта составила 10 825 нуклеотидов, а у восточносибирского – 10 905. Как и у других известных представителей ВКЭ европейского субтипа, геномные структуры исследуемых штаммов содержали по 132 нуклеотида в 5'-некодирующей области (100% гомологии в обеих группах и 3% различий между группами) и по 10 242 в области, кодирующей полипротеин-предшественник трех структурных и семи неструктурных вирусных белков ($> 99,9\%$ гомологии внутри групп и 99,9% гомологии между группами).

3'-нетранслируемый участок исследуемых геномов сопоставим по протяженности и структуре с аналогичной областью штамма *Hypr* (461 н.о.) и составляет для штаммов из Западной Сибири 451 н.о., а для штаммов из Восточной Сибири 531 н.о.

Генетически наиболее близкими к штаммам восточносибирского варианта ВКЭ европейского субтипа оказались штаммы из Южной Кореи. Штаммы из Западной Сибири преимущественно группировались со штаммами из Европы. Гомология восточносибирских и западносибирских штаммов с прототипным штаммом европейского субтипа *Neudoerfl* составила 97,4 и 97,6% соответственно. В группу

Рисунок 1.

Результаты сопоставления кодирующей области 140 полногеномных последовательностей вируса КЭ с помощью компьютерной программы MEGA5 [8] методом объединения ближайших соседей с использованием 2-параметрической модели Кимуры. Штаммы, полногеномные последовательности которых расшифрованы в ходе данного исследования, выделены подчеркиванием. Штаммы от больных КЭ людей помечены ромбами

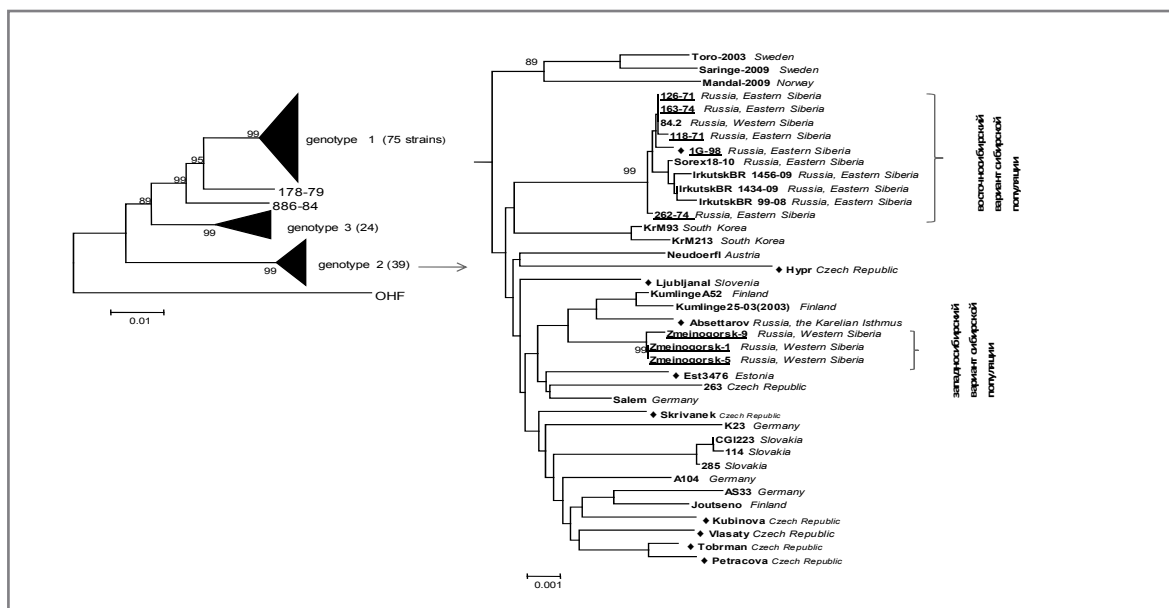


Таблица 2.

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 (%)
Дальневосточный	75	6,6	2,9
Европейский	39	3,1	1,5
Сибирский	24	7,8	4,2

восточносибирских штаммов вошло 9 штаммов из Иркутской области и штамм 84.2 (HM120875) из Алтая. Различия по кодирующей части генома в этой группе не превышали 0,5%.

Алтайские штаммы *Zmeinogorsk-1*, *Zmeinogorsk-5* и *Zmeinogorsk-9* составили группу западносибирского варианта (> 99,9%). Наиболее близким к ним по уровню гомологии оказался штамм *Absettarov* (KJ000002) из Карелии, изолированный в 1951 году от больного КЭ человека (99,3% гомологии по кодирующей части генома со штаммами из Змеиногорска и 97,7% – со штаммом *Neudoerfl*).

Среди изолятов ВКЭ, выделенных от больных людей у сибирского штамма 1G-98 наибольшее генетическое сходство наблюдается со штаммами *Absettarov* из Карелии и *Est3476* из Эстонии.

Аминокислотные замены у 13 штаммов из Сибири, выявленные при сопоставлении 39 полипротеиновых последовательностей ВКЭ европейского субтипа по 3414 аминокислотных остатков каждая,

показаны в таблице 3. Замены не обнаружены только в белке NS2B. Вне зависимости от источника выделения восточносибирский и западносибирский варианты ВКЭ европейского субтипа однозначно расходятся по сочетаниям аминокислотных замен в 29 позициях (номера позиций выделены в табл. 3 жирным шрифтом) в 9 из 10 белков вируса.

Полученные данные свидетельствуют о крайне высокой консервативности генома ВКЭ европейского субтипа вне зависимости от источника выделения (клещи, мелкие млекопитающие, кровь человека). Эти результаты хорошо согласуются с данными литературы. Так, при анализе последовательностей геномов штаммов ВКЭ, выделенных в Центральной Европе, была показана стабильность генома европейского субтипа [14]. Также, при сравнительном анализе кодирующей части полногеномных последовательностей ВКЭ из GenBank, было обнаружено, что штаммы европейского субтипа, по сравнению с представителями дальневосточного и сибирского субтипов, характеризуются

Таблица 3. Аминокислотные замены у 13 штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа из Западной и Восточной Сибири

Protein	C		prM		E					NS1					NS2A				NS3			
	31	77	147	159	163	21	47	67	246	335	154	174	237	287	294	42	53	124	141	33	247	447
Protein position																						
Far Eastern subtype	V,A	K,R	V	V,A,L	L	V	S	D,N	A,V	T	F	E	V	T,I	K	V	I,V	G	I	L	R,M	T
Siberian subtype	V	K	V	V	L	V	S	D,N	A	T	F	E	V	T	K,R	V	I	S	I	L	R	T,I
European subtype	V,A	K	L	V	L	V	A	D	A	T	F	E	V	T,V,A	K	V	I,M	S,N	I	F,L	R	T
Штаммы из Западной Сибири																						
Zmeinogorsk-1*	A	K	L	A	L	V	A	D	V	T	L	E	V	I	R	I	I	S	I	L	R	T
Zmeinogorsk-5*	A	K	L	A	L	V	A	D	V	T	L	E	V	I	R	I	I	S	I	L	R	T
Zmeinogorsk-9*	A	K	L	A	S	V	A	D	V	T	L	E	V	I	R	I	I	S	I	L	R	T
84.2	V	R	M	V	L	V	A	D	A	T	F	K	M	T	K	V	M	G	M	F	R	I
Штаммы из Восточной Сибири																						
1G98*	V	R	M	V	L	V	A	G	A	T	F	K	M	T	K	V	M	E	M	F	R	I
118-71*	V	R	M	V	L	V	A	D	A	T	F	K	M	T	K	V	M	G	M	F	K	I
126-71*	V	R	M	V	L	V	A	D	A	T	F	K	M	T	K	V	M	G	M	F	R	I
163-74*	V	R	M	V	L	V	A	D	A	T	F	K	M	T	K	V	M	G	M	F	R	I
262-74*	V	R	M	V	L	V	A	D	A	T	F	K	M	T	K	V	M	G	M	F	R	I
Sorex 18-10	V	R	M	V	L	I	S	D	A	I	F	K	M	T	K	V	M	G	M	F	R	I
IrkutskBR 1456-09	V	R	M	V	L	I	A	D	A	I	F	K	M	T	K	V	M	G	M	F	R	I
IrkutskBR 1434-09	V	R	M	V	L	I	A	D	A	I	F	K	M	T	K	V	M	G	M	F	R	I
IrkutskBR 99-08	V	R	M	V	L	I	A	D	A	I	F	K	M	T	K	V	M	G	M	F	R	I

Protein	NS4A					NS4B					NS5								
Protein position	32	54	55	121	126	21	56	119	250	101	290	329	434	521	699	701	724	786	897
Far Eastern subtype	H	V	V _A ,T	E	R	H	I	F	S	K _i R	G	L	Q	K	V	F	A _S VT	V _I ,T _A ,F	K, R
Siberian subtype	H	M,L	V	E	R	Q	I	F	S	K	G _i S	L	Q _i H	K	V _A	F	A _i T	V _A	R
European subtype	H	M	V _A	E	R	Q _i R	I	L _i F	G	R _i K	S _i N	L	H _i R _i Q	K _i R	A _i V	F _i L	A _i T _S	V _A	R _i K
Штаммы из Западной Сибири																			
Zmeinogorsk-1*	R	M	V	E	R	Q	I	L	G	K	G	L	R	K	A	L	T	V	K
Zmeinogorsk-5*	R	M	V	E	R	Q	I	L	G	K	G	L	R	K	A	L	T	V	K
Zmeinogorsk-9*	R	M	V	E	R	Q	I	L	G	K	G	L	R	K	A	L	T	I	K
84.2	H	M	A	E	R	R	V	F	G	R	S	L	H	Q	P	F	A	V	R
Штаммы из Восточной Сибири																			
1G98*	H	M	A	E	R	R	V	F	G	R	S	L	H	Q	P	F	A	V	R
118-71*	H	M	A	E	R	R	V	F	G	R	S	L	H	Q	P	F	A	V	R
126-71*	H	M	A	E	R	R	V	F	G	R	S	L	H	Q	P	F	A	V	R
163-74*	H	M	A	E	R	R	V	F	G	R	S	L	H	Q	P	F	A	V	R
262-74*	H	M	A	E	R	R	V	F	S	R	S	L	H	Q	P	F	A	V	R
Sorex 18-10	H	M	A	E	R	R	V	F	G	R	S	L	H	Q	P	F	A	V	R
IrkutskBR 1456-09	H	I	A	E	R	R	V	F	G	R	S	F	H	Q	P	F	A	V	R
IrkutskBR 1434-09	H	M	A	E	R	R	V	F	G	R	S	L	H	Q	P	F	A	V	R
IrkutskBR 99-08	H	M	A	D	T	R	V	F	G	R	S	L	H	Q	P	F	A	V	R

Примечание. В группе дальневосточного субтипа представлены полипротеиновые структуры 75 штаммов, в группе сибирского субтипа – 24, а в группе европейского субтипа – 26. Звездочкой помечены штаммы, являющиеся основными объектами настоящего исследования; светло-серым цветом – нехарактерные для генотипа 2 ВКЗ замены; белым шрифтом в темном поле – уникальные (штаммоспецифические) замены.

Таблица 4.

Генетический признак S штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа

Штамм	Источник изоляции	Размер бляшек (мм)	S-признак
134-71	Суслик длиннохвостый	1,5 – 2,0	–
118-71	Суслик длиннохвостый	3,5	+
272-75	Полевка узкочерепная	1,5 – 2,0	–
898-84	Красная полевка	3,5 – 5,0	+

наиболее высокими уровнями гомологии как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей внутри субтипа [15, 16].

Для получения фенотипической характеристики ВКЭ европейского субтипа, циркулирующего на территории Сибири проведено определение цитопатической активности штаммов вируса, размера и характера бляшек, образуемых им в культуре клеток под агаровым покрытием (S-признак), способности к репродукции при различных температурах (rct - или ts -признак).

Сведения о бляшкообразующей активности четырех штаммов ВКЭ европейского субтипа из Восточной Сибири представлены в таблице 4.

У исследованных штаммов величина бляшек (S-признак) варьировала от 1,5 – 2,0 до 5,0 мм в диаметре. Штаммы 134-71 и 272-75 образовывали только мелкие бляшки (S-признак) диаметром 1,5 – 2,0 мм. Штаммы 118-71 и 898-84 в культуре клеток СПЭВ формировали крупные бляшки (S⁺-признак) – 3,5 мм и 3,5 – 5,0 мм соответственно. Gaumann R. и соавт. при исследовании изолятов ВКЭ европейского субтипа из Швейцарии также указывали на гетерогенность штаммов по данному признаку. Они отмечали, что большая часть изученных ими штаммов формировала смесь бляшек различных размеров. Бляшки небольшого размера были ассоциированы со штаммами, изолированными в природных очагах, где заболеваемость клещевым энцефалитом отсутствует или регистрируются только спорадические случаи заболевания [17].

Следующим этапом изучения штаммов ВКЭ европейского субтипа, изолированных на территории

Сибири, было определение генетических маркеров rct_{37} и rct_{42} (табл. 5).

Исследованные штаммы активно размножались в культуре клеток СПЭВ, вызывая разрушение клеточного монослоя на 4 – 6-е сутки. Показатель $IgTCD_{50/мл}$ при 37 °C варьировал от 4,23 до 8,78.

Результаты определения индекса инактивации штаммов показали, что четыре штамма из пяти были устойчивыми к прогреванию (T_{50}^{+}), а штамм 134-71 оказался термолабильным.

Также была определена способность штаммов ВКЭ европейского субтипа репродуцироваться при температуре 42 °C. Четыре штамма (1G-98, 898-84, 134-71, 272-75) активно размножались при супраоптимальной температуре 42 °C, что свидетельствует об их хороших адаптационных возможностях. Низкая способность размножаться при данной температуре (rct_{42} -признак) отмечена у штамма 118-71.

В характеристике фенотипических свойств вирусов наиболее важны их патогенные свойства. Инфекционное титрование выявило, что четыре штамма ВКЭ европейского субтипа (1G-98, 898-84, 262-74 и 126-71) характеризовались высокой церебральной и периферической активностью (табл. 6). Индекс инвазивности у этих штаммов был меньше 3,0, что свидетельствует об их способности преодолевать гематоэнцефалический барьер, достигать ЦНС и размножаться в ней. Аналогичные данные были получены Р.В. Адельшиным и соавт. при изучении вирулентности четырех штаммов ВКЭ европейского субтипа, изолированных на территории Прибайкалья [18]. Два штамма из Восточной

Таблица 5.

Результаты определения генетических маркеров rct_{37} , rct_{42} и T_{50} штаммов ВКЭ европейского субтипа

Штамм	Источник изоляции	Генетические признаки				
		$IgTCD_{50/мл}$ при 37 °C	rct_{42}		T_{50}	
			Разница в $IgTCD_{50/мл}$ при 37 – 42 °C	Выраженность признака	Индекс инактивации в $IgTCD_{50/мл}$ при 37 – 42 °C	Выраженность признака
1G-98	кровь больного	5,0	1,0	+	1,0	+
898-84	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	+

Таблица 6.
Результаты определения индекса инвазивности

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

Сибири (118-71 и 163-74), а также штаммы Змеиногоorsk-1 и Змеиногоorsk-7 характеризовались низкой периферической активностью. R. Gaumann и соавт. при исследовании вирулентности шести штаммов ВКЭ европейского субтипа из Швейцарии отмечали, что все они проявляли высокую нейровирулентность, но при этом обладали низкой инвазивностью [17].

Как уже упоминалось выше, ВКЭ европейского субтипа циркулирует в экосистемах значительно различающихся климатическими условиями, рельефом, составом природных комплексов и биоценозов. Основным видом переносчика ВКЭ европейского субтипа в Европе являются клещи *I. ricinus* [19, 20]. Так в международной электронной базе данных GenBank присутствует информация о полногеномных структурах штаммов, изолированных из *I. ricinus* как на территории Центральной Европы (Германия, Австрия, Чешская Республика, Словакия), так и на территории Северной Европы (Швеция, Финляндия и Норвегия). В Европе в единичных случаях ВКЭ был также обнаружен в других видах клещей: *Ixodes hexagonus*, *I. arboricola*, *Haemaphysalis concinna*, *Dermacentor marginatus* и *D. reticulatus* [19]. Например, в восточной Польше 10,8% клещей *D. reticulatus* были инфицированы ВКЭ европейского субтипа [20].

В Азиатской части России основным переносчиком ВКЭ, в том числе и европейского субтипа, является клещ *I. persulcatus* [21]. В клещах этого вида ВКЭ европейского субтипа был также обнаружен на территории Финляндии [22]. В Республике Корея потенциальными векторами в передаче ВКЭ данного субтипа являются *Haemaphysalis longicornis*, *H. flava* и *Ixodes nipponensis*. Вирусофорность этих видов клещей составила 0,06%, 0,17% и 2,38% соответственно [16]. Также имеется сообщение об изоляции штаммов европейского субтипа из клещей *D. marginatus* на территории Угловского района Алтайского края (Россия) и Карагандинской области Республики Казахстан [23].

Естественными резервуарными хозяевами ВКЭ, играющими основную роль в передаче ви-

руса, являются грызуны (*Clethrionomys (Myodes)*, *Apodemus*, *Mus*, *Microtus*, *Micromys*, *Pitymys*, *Arvicola*, *Glis*, *Sciurus* и *Citellus*) [24], насекомоядные (*Sorex*, *Talpa*, *Erinaceus*) [24] и плотоядные (*Vulpes*, *Mustela*) [19, 25].

В базе данных GenBank имеются нуклеотидные последовательности штаммов ВКЭ европейского субтипа, изолированных на территории Европы от *Myodes glareolus* (KC835597), *Apodemus sylvaticus*, *Sciurus vulgaris*, *Apodemus flavicollis* (KF151173). К. Achazi и соавт. сообщали о детекции ВКЭ от шести видов грызунов: *Apodemus agrarius*, *A. avicollis*, *A. sylvaticus*, *Microtus agrestis*, *M. arvalis*, and *Myodes glareolus* [26].

На территории Южной Кореи штаммы ВКЭ европейского субтипа были изолированы от *Apodemus agrarius* [5, 6]. В Восточной Сибири штаммы ВКЭ европейского субтипа были выделены от суслика длиннохвостого (*Spermophilus undulatus*), узкочерепной полевки (*Microtus gregalis*), лесной мыши (*Apodemus sylvaticus*), красной полевки (*Myodes rutilus*) [7], буроzubки (sp. *Sorex*) [13]. На территории Западной Сибири этот субтип вируса был изолирован от грызунов: красно-серой полевки (*Myodes rufocanus*), красной полевки (*M. rutilus*), плоскочерепной полевки (*Alticola strelzovi*), большеухой полевки (*A. macrotis*), узкочерепной полевки (*Microtus gregalis*), полевки экономки (*M. oeconomus*), а также от зайцеобразных: алтайской пищухи (*Ochotona alpina*) [23]. Кроме того, на территории Алтая ВКЭ европейского субтипа был выделен от птиц *Anthus spinoletta* (горный конек) [23].

Биотопы, в которых была установлена циркуляция ВКЭ европейского субтипа, на территории Сибири отличаются значительным разнообразием. Так, в нашем исследовании семь штаммов вируса были изолированы из материала, собранного на территории Эхирит-Булагатского района Иркутской области. Район характеризуется умеренно теплым и недостаточно влажным климатом. Ему присуще сложное сочетание таежных ландшафтов с участками перехода от лесостепных к степным ландшафтам. Фауна, обитающая на территории Эхирит-Булагат-

ского района, отличается наличием биоценологических группировок, свойственных таежным, подтаежным, лесостепным и степным ландшафтам. Для Змеиногорского района Алтайского края, на территории которого было изолировано пять штаммов ВКЭ европейского субтипа, также свойственна неоднородность ландшафтов. Большая часть района расположена в пределах степной зоны. По долинам рек, ручьев встречается разнотравно-лугово-мятликотый тип растительности. Растительность лесного пояса представлена осиново-березово-сосновыми лесами, а юго-восточную часть района занимают осиново-пихтовые леса. Для Иркутского района Иркутской области, на территории которого также были изолированы штаммы ВКЭ европейского субтипа, характерно наличие подтаежных (подгорных) лиственнично-сосновых травяно-брусничных злаково-разнотравных лесов.

Штаммы ВКЭ европейского субтипа на территории Сибири были изолированы на территориях с различным типом рельефа – от равнин (от 200 м н. у. м.) до среднегорья (выше 2200 м н. у. м.) [23].

Выводы

1. Впервые получена комплексная характеристика ВКЭ европейского субтипа, циркулирующего на территории Западной и Восточной Сибири. Показано, что штаммы ВКЭ европейского субтипа из Сибири генетически сходны со штаммами из европейской части ареала и с представителями из Южной Кореи. Гомология всех известных штаммов ВКЭ европейского субтипа, изолированных в разных точках обширнейшего ареала вируса от скандинавских стран на западе до восточных границ ареала (Южная Корея и Восточная Сибирь России), гораздо выше, чем степень гомологии у штаммов ВКЭ дальневосточного и сибирского субтипов.

2. Сибирская популяция ВКЭ европейского субтипа на обследованных территориях представлена двумя группами штаммов, обозначенными как восточносибирский и западносибирский варианты, поскольку один вариант циркулирует на территории Западной Сибири, а другой, в основном, – в Восточной Сибири. Эти варианты отличаются по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B.
3. Популяция ВКЭ европейского субтипа на территории Сибири гетерогенна по фенотипическим свойствам. Выявлено, что штаммы ВКЭ европейского субтипа из Сибири обладают высокой нейровирулентностью, но часть из них, аналогично штаммам из Европы, проявляет низкую инвазивность. Штаммы ВКЭ европейского субтипа из Сибири обладают хорошими адаптивными способностями и, следовательно, могут легко приспосабливаться к циркуляции в составе разнообразных биоценозов на территории различных ландшафтно-географических зон.
4. Установлено, что циркуляция ВКЭ европейского субтипа на территории Сибири фиксируется на протяжении более 40 лет (год первой изоляции штамма – 1971 г., последней 2012 г.) [7, 23].

Несмотря на то, что ВКЭ европейского субтипа циркулирует на территориях, значительно различающихся по климатическим условиям, рельефу, ландшафту, характеристикам биотопов он обладает высокой степенью стабильности генома. Исследование этого феномена, также как и вопросы происхождения ВКЭ европейского субтипа на территории Сибири, эволюции вируса требуют дальнейшего углубленного изучения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00615).

Литература

1. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.J., Lefkowitz E.B. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press; 2012.
2. Злобин В.И., Демина Т.В., Беликов С.И., Бутина Т.В., Горин О.З., Адельшин Р.В. и др. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа уровней гомологии фрагмента гена белка оболочки. Вопросы вирусологии. 2001; 46: 17 – 22.
3. Злобин В.И., Демина Т.В., Мамаев Л.В., Бутина Т.В., Беликов С.И., Горин О.З. и др. Анализ генетической вариативности штаммов вируса клещевого энцефалита по первичной структуре фрагмента гена белка оболочки Е. Вопросы вирусологии. 2001; 46: 12 – 16.
4. Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Козлова И.В., Верховина М.М., Ткачев С.Е., Дорошенко Е.К. и др. Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования. Вопросы вирусологии. 2012; 57 (4): 13 – 19.
5. Kim S.Y., Yun S.M., Han M.G., Lee I.Y., Lee N.Y. et al. Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008; 8 (1): 7 – 13.
6. Yun S.M., Kim S.Y., Han M.G., Jeong Y.E., Yong T.S., Lee 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; 9 (3): 287 – 293.
7. Верховина М.М., Козлова И.В., Демина Т.В., Джиоев Ю.П. Молекулярно-эпидемиологическая и эколого-географическая характеристика вируса клещевого энцефалита в Восточной Сибири. В кн.: Инфекции, передаваемые иксодовыми клещами в Сибирском регионе. Новосибирск: СО РАН; 2011; 30: 84 – 107.
8. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 2013; 30: 2725 – 2729.
9. Pletnev A.G., Yamshikov 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; 174: 250 – 263.
10. Reed L., Muench H.A. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. Am. J. Hyg. 1938; 27: 493 – 497.
11. 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; 8: 424 – 434.
12. Овчинникова Э.А., Карпович Л.Г., Левкович Е.Н. Изучение терморезистентности штаммов вируса комплекса клещевого энцефалита, обладающих различной нейровирулентностью для лабораторных животных. Вopr. вирусол. 1967; 5: 607.

13. 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). pii: e00609-15. doi: 10.1128/genomeA.00609-15.
14. Weidmann M., Frey S., Freire C.C., Essbauer S. et al. Molecular phylogeography of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *J. Gen. virol.* 2013; 94: 2129 – 2139.
15. 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. *Journal of Medical Virology.* 2010; 82: 965 – 976.
16. Yun S.M., Song D.G., Choi W., Park W.I. 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; 3 (4): 213 – 221.
17. Gumann R., Rekd D., Hlemann K., Strasser M., Beuret C.M. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis virus field isolates from Switzerland. *J. Med. Virol.* 2011; 83 (5): 853 – 863.
18. Adelshin R.V., Melnikova O.V., Trishina Y.N., Andaev E.I. Tick-borne encephalitis virus isolates features from natural foci of Pribaikalie (Eastern Siberia, Russia). *J. Dis. Epidemiol.* 2015; 1 – 4.
19. Suss J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine.* 2003; 21 (1): 19 – 35.
20. 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; 2 (1): 16 – 19.
21. Злобин В.И., Беликов С.И., Джиоев Ю.П., Демина Т.В., Козлова И.В. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН; 2003: 272.
22. Jaaskelainen A.E., Tonteri E., Sironen T., Pakarinen L., Vaheri A., Vapalahti O. European subtype tick-borne encephalitis virus in *Ixodes persulcatus* ticks. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17 (2): 323 – 325.
23. Якименко В.В., Ткачев С.Е., Макенов М.Т., Малькова М.Г., Любенко А.Ф., Рудакова С.А. и др. О распространении вируса клещевого энцефалита европейского субтипа в Западной Сибири и на Алтае. Дальневосточный журнал инфекц. патологии. 2015; 27: 29-35.
24. Kozuch O., Nosek J., Chmela E., Uvizi M., Bolek S. The ecology of the virus of tick-borne encephalitis in the natural foci in the Olomouc district. *Cesk. Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 1976; 25 (2): 88 – 96.
25. International Catalogue of Arboviruses. 3rd Edition. Karabatsos N (Eds). American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, TX, USA, 1985.
26. Achazi K., Rekd D., Donoso-Mantke O., Schlegel M., Ali Hanan Sheikh, Wenk M. et al. Rodents as Sentinels for the Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Vector-borne and zoonotic diseases.* 2011; 11 (6): 641 – 647.

References

1. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.J., Lefkowitz E.B. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press; 2012.
2. Zlobin V.I., Demina T.V., Belikov S.I., Butina T.V., Gorin O.Z., Adelshin R.V. et al. Genetic typing of TBEV strains in terms of homology analysis of an envelope protein's gene fragment. *Voprosi Virusologii [Problems of Virology]* (46)1:17 – 22 (in Russian).
3. Zlobin V.I., Demina T.V., Mamaev L.V., Butina T.V., Belikov S.I., Gorin O.Z. et al. Analysis of genetic variability of TBEV strains on the primary structure of a cover protein's gene fragment. *Voprosi Virusologii [Problems of Virology]* (46)1:12 – 16 (in Russian).
4. Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Kozlova I.V., Verhozina M.M., Tkachev S.E., Doroschenko E.K. et al. Lisak O.V., Paramonov A.I., Zlobin V.I. Genotypes 4 and 5 of the tick-borne encephalitis virus: features of the genome structure and possible scenario for its formation. *Voprosi Virusologii [Problems of Virology]* 2012; 57 (4): 13 – 19 (in Russian).
5. Kim S.Y., Yun S.M., Han M.G., Lee I.Y., Lee N.Y. et al. Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008; 8 (1): 7 – 13.
6. Yun S.M., Kim S.Y., Han M.G., Jeong Y.E., Yong T.S., Lee 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; 9 (3): 287 – 293.
7. Verhozina M.M., Kozlova I.V., Demina T.V., Dzhioev Yu.P. Molecular epidemiological and ecological and geographical characteristics of viral encephalitis in eastern Siberia. In: *Infections transmitted by ticks in the Siberian region.* Novosibirsk, SB RAS. 2011; (30): 84 – 107 (in Russian).
8. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipi A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* 2013; 30: 2725 – 2729.
9. Pletnev A.G., Yamshikov 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; 174: 250–263.
10. Reed L., Muench H.A. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493 – 497.
11. 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; 8: 424 – 434.
12. Ovchinnikova E.A., Karpovich L.G., Levkovich E.N. The study of complex thermal resistance of the virus encephalitis strains with varying neurovirulence for laboratory animals. *Voprosi Virusologii [Problems of Virology]* 1967; 5: 607.
13. 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). pii: e00609-15. doi: 10.1128/genomeA.00609-15.
14. Weidmann M., Frey S., Freire C.C., Essbauer S. et al. Molecular phylogeography of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *J. Gen. virol.* 2013; 94: 2129 – 2139.
15. 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. *Journal of Medical Virology.* 2010; 82: 965 – 976.
16. Yun S.M., Song D.G., Choi W., Park W.I. 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; 3(4): 213-221.
17. Gumann R., Rekd D., Hlemann K., Strasser M., Beuret C.M. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis virus field isolates from Switzerland. *J. Med. Virol.* 2011; 83 (5): 853 – 863.
18. Adelshin R.V., Melnikova O.V., Trishina Y.N., Andaev E.I. Tick-borne encephalitis virus isolates features from natural foci of Pribaikalie (Eastern Siberia, Russia). *J. Dis. Epidemiol.* 2015; 1 – 4.
19. Suss J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine.* 2003; 21 (1): 19 – 35.
20. Wojcik-Fatla A., Cisak E., Zajac V., Zwolinski J., Dutkiewicz J. (2011). – 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; 2 (1): 16 – 19.
21. Zlobin V.I., Belikov S.I., Dzhioev Yu.P., Demina T.V., Kozlova I.V. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis. *Irkutsk:* 2003: 272.
22. Jaaskelainen A.E., Tonteri E., Sironen T., Pakarinen L., Vaheri A., Vapalahti O. European subtype tick-borne encephalitis virus in *Ixodes persulcatus* ticks. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17 (2): 323 – 325.
23. Yakimenko V.V., Tkachev S.E., Makenov M.T., Mal'kova M.G., Lyubenko A.F., Rudakova S.A. et al. On the propagation of the virus encephalitis European subtype in Western Siberia and Altai. *Dal'nevostochnii zhurnal infekcionnoi patologii [Far East Journal of Infectious pathology].* 2015; 27: 29 – 35.
24. Kozuch O., Nosek J., Chmela E., Uvizi M., Bolek S. The ecology of the virus of tick-borne encephalitis in the natural foci in the Olomouc district (author's transl). *Cesk. Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 1976; 25 (2): 88-96.
25. International Catalogue of Arboviruses. 3rd Edition. Karabatsos N (Eds). American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, TX, USA, 1985.
26. Achazi K., Rekd D., Donoso-Mantke O., Schlegel M., Ali Hanan Sheikh, Wenk M. et al. Rodents as Sentinels for the Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Vector-borne and zoonotic diseases.* 2011; 11 (6): 641 – 647.