

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН
(Институт полиомиелита)

На правах рукописи

Кучина Виктория Владимировна

**Экспериментальная характеристика актуальных для России
ортофлавивирусных инфекций на фоне предсуществующих
антител к вирусу клещевого энцефалита**

1.5.10. Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Карганова Галина Григорьевна

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Таксономия.....	13
1.2 Строение вирионов ортофлавивирусов	13
1.3 Строение и функции структурных белков ортофлавивирусов	15
1.4 Неструктурные белки ортофлавивирусов	17
1.5 Жизненный цикл ортофлавивирусов	19
1.5.1 Прикрепление и проникновение	19
1.5.2 Трансляция и репликация вирусного генома.....	21
1.5.3 Процессинг вирусного полипротеина	21
1.5.4 Репликация	22
1.5.5 Сборка и выход вирусных частиц.....	23
1.6 Экология и эпидемиология	23
1.7 Патогенез и клиническая картина	26
1.7.1 Клещевой энцефалит.....	26
1.7.2 Омская геморрагическая лихорадка	27
1.7.3 Лихорадка Повассан.....	27
1.7.4 Лихорадка Западного Нила	28
1.8 Внешний путь свёртывания крови	28
1.9 Иммунный ответ при ортофлавивирусных инфекциях	30
1.9.1 Врожденный иммунный ответ	30
1.9.2 НК-лимфоциты	33
1.9.3 Гуморальный иммунитет	34
1.9.4 Т-клеточный ответ.....	35
1.10 Ортофлавивирусные инфекции на лабораторных животных.....	37
1.11 Профилактика ортофлавивирусных инфекций.....	39
1.12 Первичный антигенный грех	41
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
2.1 Животные.....	43
2.2 Клетки и вирусы.....	44
2.3 Вакцинация и заражение	45
2.4 Титрование вирусов и реакция нейтрализации	47
2.5 Получение гипериммунной асцитной жидкости	48
2.6 Пробоподготовка для определения вируса в органах	48
2.7 Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР в РВ)	48

2.8	Получение стандартов полиовируса для ПЦР в реальном времени	50
2.9	Приготовление стандартов ВКЭ для ПЦР в РВ.....	51
2.10	Приготовление стандартов ВПОВ для ПЦР в реальном времени	51
2.11	Определение биомаркеров иммунного ответа в сыворотках крови лабораторных животных	52
2.12	Титрование на мышах	52
2.13	Время	53
2.14	Анализ крови	53
2.15	ИФА на основе рекомбинантных белков Е ВКЭ	54
2.16	Статистический анализ.....	54
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ		55
3.1	Определение протективности вакцины клещевого энцефалита против ВОГЛ и ВПОВ на разные сроки после иммунизации на мышах линии BALB/c.....	55
3.1.1	Характеристика исследуемых ортофлавириусов	55
3.1.2	Влияние возраста мышей линии BALB/c на течение ортофлавириусной инфекции, вызванной ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ	56
3.1.3	Изменение титров НАТ с возрастом.....	58
3.1.4	Изменение поствакцинального иммунного ответа к ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ после иммунизации вакциной КЭ в зависимости от срока после вакцинации	58
3.1.5	Протективность вакцины КЭ против исследуемых вирусов	60
3.1.6	Выживаемость мышей, зараженных ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ через 1 месяц после однократной и двукратной иммунизации вакциной КЭ	60
3.1.7	Выживаемость мышей, зараженных разными дозами ВЗН через 1 месяц после иммунизации вакциной КЭ	62
3.1.8	Уровень НАТ в сыворотках мышей после заражения ВОГЛ и ВПОВ через месяц после однократной и двукратной иммунизации вакциной КЭ.....	64
3.1.9	Выживаемость мышей, зараженных ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ через 3 месяца после двукратной иммунизации вакциной КЭ.....	66
3.1.10	Уровень НАТ в сыворотках мышей после заражения ВОГЛ и ВПОВ через три месяца после двукратной иммунизации вакциной КЭ	67
3.1.11	Выживаемость мышей, зараженных ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ через один год после иммунизации вакциной КЭ	68
3.1.12	Уровень НАТ в сыворотках мышей после заражения ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ через один год после двукратной иммунизации вакциной КЭ.....	70
3.1.13	Титры НАТ через месяц после заражения ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ в сыворотках мышей с предварительной иммунизацией вакциной КЭ	72
3.1.14	Протромбиновое время	73
3.1.15	Биомаркеры иммунного ответа в процессе инфекций, вызванных ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ, ВЗН	75

3.2	Смешанная инфекция ВКЭ и ВПОВ на мышах	79
3.3	Моделирование бессимптомной ортофлавивирусной инфекции на обезьянах вида <i>Macaca fascicularis</i>	80
3.3.1	Предсуществующие антитела к ортофлавивирусам у интактных животных	81
3.3.2	Исследование биохимических показателей крови обезьян вида <i>Macaca fascicularis</i> после заражения ВКЭ, ВПОВ и смешанной инфекции ВКЭ и ВПОВ	81
3.3.3	Вирусная нагрузка в крови и органах обезьян вида <i>Macaca fascicularis</i> после заражения ВКЭ, ВПОВ и смешанной инфекции ВКЭ и ВПОВ.	85
3.3.4	Показатели крови обезьян вида <i>Macaca fascicularis</i> после заражения ВКЭ, ВПОВ и смешанной инфекции ВКЭ и ВПОВ	87
3.3.5	Определения ИФНа в сыворотках крови обезьян вида <i>Macaca fascicularis</i> после заражения ВКЭ, ВПОВ и смешанной инфекции ВКЭ и ВПОВ.....	89
3.3.6	Динамика титров НАТ в крови обезьян вида <i>Macaca fascicularis</i> после заражения ВКЭ, ВПОВ и смешанной инфекции ВКЭ+ВПОВ	90
3.3.7	Динамика титров НАТ в крови обезьян вида <i>Macaca fascicularis</i> предварительно иммунизированных вакциной КЭ и заражённых ВПОВ	92
3.3.9	Выявление АТ к доменам белка Е ВКЭ в сыворотках обезьян вида <i>Macaca fascicularis</i> после заражения ВКЭ, ВПОВ и смешанной инфекции ВКЭ и ВПОВ и предварительно иммунизированных вакциной КЭ с последующим заражением ВПОВ.....	95
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	98
	Список сокращений	107
	Список литературы	109

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Для многих вирусных инфекций характерны перекрёсты в серологических реакциях, когда вырабатываемые в ответ на вирус антитела (АТ) могут взаимодействовать с близкородственными вирусами. В последнее время знания о роли предсуществующих противовирусных АТ на течение вирусной инфекции значительно расширились. Информация о предсуществующем гуморальном иммунном ответе необходима для разработки стратегии контроля ортофлавивирусных инфекций и профилактических и лечебных препаратов.

Ортофлавивирусы принадлежат семейству *Flaviviridae*. Большинство ортофлавивирусов относится к группе арбовирусов - вирусов, переносимых комарами и клещами. В зависимости от тропности ортофлавивирусы способны вызывать у инфицированных людей широкий спектр симптомов от легкой до тяжелой геморрагической лихорадки или поражения ЦНС. В большинстве случаев инфицирование ортофлавивирусами протекает бессимптомно. Информация о начальных этапах инфекции может быть крайне полезна для разработки подходов к предотвращению заболевания или снижению вероятности тяжелого течения. Тяжесть заболевания может определяться совокупностью параметров, которые мало изучены. К ним относятся: генетическая предрасположенность; доза и свойства вируса; состояние иммунной системы человека на момент инфицирования; сопутствующие или предшествующие инфекции. Предполагается, что различного рода стрессы могут также способствовать тяжёлому течению заболевания [1–8]. Тем не менее, особенно важным фактором является первичная иммунная реакция на патоген и наличие предсуществующих противовирусных АТ. Влияние предсуществующих АТ на течение инфекции наиболее подробно описаны для ортофлавивирусов, переносимых комарами. Для вирусов, переносимых клещами, этот вопрос мало изучен.

Наиболее распространённым из ортофлавивирусов, переносимых клещами, является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ). Ежегодно в мире регистрируется около от 10000 до 15000 случаев клещевого энцефалита (КЭ) [9]. Для профилактики инфекции, вызванной ВКЭ, существует пять инактивированных вакцин, и с каждым годом охват населения вакцинацией увеличивается.

В некоторых регионах мира, где ВКЭ является эндемичным, были выявлены и другие ортофлавивирусы. К ним относятся вирус омской геморрагической лихорадки (ВОГЛ) - в Западной Сибири и Казахстане; вирус Повассан (ВПОВ) - на Дальнем Востоке

России; вирус японского энцефалита (ВЯЭ) - на Дальнем Востоке России и в Китае; вирус Западного Нила (ВЗН) - в Европе и европейской части России, против которых нет зарегистрированных вакцин [10–14]. Таким образом, существуют смешанные очаги нескольких ортофлавивирусов.

На территории РФ имеется достаточно высокая иммунная прослойка населения с антителами к ВКЭ в результате вакцинации против клещевого энцефалита (КЭ) или контакта людей с вирусом. Наличие сочетанных очагов нескольких ортофлавивирусов, а также активно развивающийся туризм в страны, эндемичные по другим ортофлавивирусам, увеличивает вероятность одновременного или последовательного инфицирования несколькими вирусами или инфицирование разными ортофлавивирусами на фоне поствакцинального иммунного ответа к ВКЭ [1,15].

Сходство поверхностных белков ортофлавивирусов приводит к образованию перекрестно-реактивных АТ. Такие АТ, индуцированные вакцинацией или первичной инфекцией, могут играть защитную роль при заражении близкородственными вирусами, но также стать причиной антителозависимого усиления инфекции (antibody-dependent enhancement - ADE). Для переносимых комарами ортофлавивирусов показано, что ADE представляет большую проблему. Можно предположить, что вакцина КЭ может защищать от других ортофлавивирусов, циркулирующих на территории РФ. Уже имеются некоторые данные о защите вакцины КЭ от ВОГЛ. Однако влияние перекрёстно-реактивных антител к ВКЭ на течение вирусной инфекции, вызванной близкородственными вирусами, с точки зрения риска ADE изучено недостаточно.

Изучение начальных этапов КЭ затруднено, т.к. обычно пациенты обращаются в медицинские учреждения на более поздней стадии заболевания. Это определяет необходимость использования адекватной животной модели для более детального изучения инфекции сразу после заражения. Наиболее удобной и распространенной моделью для изучения ортофлавивирусной инфекции является мышьяная модель [16,17]. Поскольку лабораторные мыши высоко восприимчивы к исследуемым ортофлавивирусам, их используют для оценки протективности противовирусных препаратов. Тем не менее моделирование лёгких форм КЭ с использованием лабораторных мышей может быть недостаточно информативно при изучении факторов, определяющих форму и тяжесть заболевания [18–20]. Выбор адекватной модели ортофлавивирусной инфекции необходим не только для оценки протективности профилактических и лечебных препаратов, но и для более детального изучения формирования иммунного ответа, а также риска ADE.

Степень разработанности темы

Поствакцинальный и постинфекционный иммунитет к ВКЭ описан достаточно подробно на людях и лабораторных животных. Для ВПОВ и ВОГЛ такие данные тоже имеются, однако в литературе они представлены в значительно меньшем объеме. Особенно мало информации, касающейся описания инфекций, вызванных этими вирусами, на обезьянах, хотя именно обезьянья модель является наиболее информативной для изучения формирования иммунного ответа при инаппарантной (бессимптомной) инфекции. Ранее было показано, что смешанная инфекция ВКЭ и ВПОВ возможна [15], но при экспериментальном заражении лабораторных животных смешанная инфекция не было описана.

На основании эпидемиологических исследований показано, что бессимптомные инфекции ВКЭ составляют от 70 до 95% в зависимости от региона [21–23]. Экспериментальных моделей бессимптомной инфекции не так много. В экспериментах на мышах по изучению инаппарантной инфекции при вирусном энцефалите, вызванном альфавирусом леса Семлики (*Togaviridae*), были показаны биохимические изменения в головном мозге мышей, а также изменения в поведении животных, при отсутствии гистологических показателей инфекции [24,25]. В экспериментах на низших приматах отмечалась виремия и незначительные гистологические изменения в мозге при бессимптомной инфекции ВКЭ и ВОГЛ [26,27]. Изучение маркеров ортофлавивирусных инфекций, на начальных этапах может быть полезно как с точки зрения диагностики, так и для прогнозирования дальнейшего течения инфекции и выбора верной стратегии лечения.

Динамика формирования антительного ответа, спектр и кросс-реактивность индуцируемых антител при заражении ВКЭ и ВПОВ на начальных этапах инфекции изучена в основном на мышинной модели [6,28]. Насколько эти данные отличаются от процессов, наблюдаемых у людей, изучено недостаточно. ADE в основном изучен для комариных ортофлавивирусов разных серокомплексов в моделях *in vivo* и *in vitro*, в том числе в экспериментах на макаках-резусах [29–35]. Наиболее подробно явление ADE было показано для вируса денге (ВДЕН), в том числе этот феномен доказан эпидемиологически [36,37]. Для комариных ортофлавивирусов показано, что ADE возможен после вакцинации [38]. Для ортофлавивирусов, переносимых клещами, вопрос ADE является открытым.

Данные по перекрёстной защитной эффективности вакцины КЭ в отношении ВОГЛ противоречивы и зависят от вида лабораторных животных, тогда как для ВПОВ количество экспериментальных данных ограничено. Вакцинация против КЭ при экспериментальном заражении приматов ВОГЛ защитила животных от развития гемолитического синдрома,

однако не предотвратила проникновение вируса в мозг и висцеральные органы [26]. В экспериментах на мышах после иммунизации инактивированной вакциной КЭ была показана защита от гибели при инфекции ВОГЛ и отсутствие явной защиты при инфекции ВПОВ [39]. Аналогичный результат был получен в экспериментах *in vitro*: сыворотки от вакцинированных мышей показали высокие защитные титры в реакции нейтрализации против ВОГЛ, но не против ВПОВ [39]. В основном такие данные получены при заражении животных в течении месяца после вакцинации КЭ. Данные об изменении спектра противовирусных АТ на отдалённые сроки после иммунизации вакциной КЭ, а также влияние этих изменений на защиту или, напротив, на усиление тяжести заболевания посредством ADE, в научной литературе отсутствуют. Влияние предсуществующих АТ ранее изучалось в основном с точки зрения протективности. Спектр индуцированных вакциной КЭ АТ при заражении близкородственными вирусами с точки зрения ADE не изучался.

Границы распространения ВЗН, переносимого комарами, расширяются, и увеличиваются территории совместной циркуляции с ВКЭ. В экспериментах *in vitro* было показано, что сыворотки мышей с иммунодомнантностью антител к доменам DI+II белка Е ВДЕН, усиливают инфекцию, вызванную ВЗН, вирусом жёлтой лихорадки (ВЖЛ) и вирусом Зика (ВЗИК) [40]. Влияние поствакцинальных или постинфекционных антител к ВКЭ на течение инфекции, вызванной ВЗН, не изучено, но так как для ортофлавириусов, переносимых комарами, характерно ADE, то это может быть потенциальной угрозой для общественного здравоохранения.

Известно, что у людей старше 50 лет процент выздоровления после заражения ВКЭ на 44% ниже, чем у людей молодого возраста (18-39 лет) [41]. В ответ на вакцинацию у пожилых людей активация В- и CD4+ Т-клеток была ниже, чем у молодых [42]. В эксперименте на мышинной модели было показано, что у старых мышей нарушена антигенпрезентирующая функция, а ослабленный мутант ВЗН вызывал повышенную продукцию воспалительных цитокинов и IL-10, задержку Т-клеточного ответа и снижение синтеза антител, специфичных к ВЗН [43]. В эксперименте на мышах линии C57BL/6 инфекция ВПОВ с возрастом животных вызывала увеличение летальности и изменение спектра индуцируемых цитокинов [44]. Изменения течения инфекции ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ, связанные с увеличением возраста мышей линии BALB/c, ранее не проводились.

Целью данной работы было описание особенностей актуальных для России ортофлавириусных инфекций на фоне поствакцинального иммунного ответа к ВКЭ в экспериментах на лабораторных животных.

В соответствие с поставленной целью были сформированы следующие **задачи**:

1. Провести моделирование инфекции, вызванной ВПОВ, на приматах *Macaca fascicularis*, а также инфекций, вызванных ВПОВ, ВКЭ, ВОГЛ и ВЗН, на мышах линии BALB/с разного возраста с выявлением патогенетических маркеров инфекции и характеристикой иммунного ответа.
2. Определить эффективность вакцины КЭ на основе дальневосточного подтипа ВКЭ в отношении ВКЭ сибирского подтипа, ВОГЛ, ВПОВ и ВЗН на разные сроки после вакцинации в экспериментах на мышах разного возраста и ВПОВ на обезьянах вида *Macaca fascicularis* с учетом возможного риска антителозависимого усиления инфекции.
3. Охарактеризовать перекрестные нейтрализующие антитела после иммунизации лабораторных животных вакциной КЭ при инфекции, вызванной гетерологичным штаммом ВКЭ, а также близкородственными ортофлавивирусами ВОГЛ, ВПОВ на разные сроки после иммунизации.

Научная новизна

1. Получена комплексная характеристики модели бессимптомной инфекции, вызванной ВПОВ, на приматах *Macaca fascicularis* с определением патогенетических маркеров на ранних стадиях инфекции.
2. Показано изменение чувствительности мышей линии BALB/с к ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ в зависимости от возраста животных.
3. В экспериментах на лабораторных животных описано влияние инфекций ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ и ВЗН на систему коагуляции крови.
4. В экспериментах на мышах установлено, что предварительная иммунизация вакциной КЭ обеспечивает длительную защиту против ВОГЛ, частичную против ВПОВ и не обеспечивает защиту от ВЗН.
5. Впервые в экспериментах на приматах и мышах проведено исследование, направленное на выявление возможности ADE, вызванного ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ и ВЗН, на фоне поствакцинального иммунного ответа к ВКЭ на отдаленные сроки после вакцинации.
6. Для переносимых клещами ортофлавивирусов впервые продемонстрирован эффект предсуществующих антител. При ортофлавивирусной инфекции на фоне поствакцинального иммунного ответа к ВКЭ титр нейтрализующих АТ к вакцинному вирусу равен или выше титров нейтрализующих антител к инфицирующему вирусу, что может полностью маскировать появление АТ к последнему.

Теоретическая и практическая значимость

В результате проведенных экспериментов на нечеловекообразных приматах и мышах был получен большой объем экспериментальных данных, имеющих важное значения для разработки и тестирования профилактических и лечебных препаратов. Была смоделирована инфекция ВПОВ на приматах и мышах, в том числе смешанная инфекция ВПОВ и ВКЭ, выявлены маркёры инфекции и показано изменение чувствительности мышей к ВПОВ с течением времени. Были выявлены преимущества и недостатки мышинной и приматной моделей: мыши линии BALB/с являются подходящей моделью для изучения острой и персистентной инфекции, вызванной ВПОВ, в зависимости от возраста, а обезьяны *Macaca fascicularis* - адекватной моделью для изучения начальных этапов формирования иммунного ответа при интранатальной инфекции. Была показана эффективность инактивированной вакцины КЭ в отношении других ортофлавивирусов (ВОГЛ, ВПОВ), имеющих смешанные очаги с ВКЭ. Полученные данные о динамике синтеза противовирусных АТ при ортофлавивирусной инфекции на фоне предсуществующего иммунного ответа к гетерологичному ортофлавивирусу являются научной базой для разработки новых и оценки эффективности существующих тест-систем для дифференциальной серодиагностики.

Методология и методы исследования

В работе были использованы современные вирусологические, серологические, иммунохимические и молекулярно-биологические методы, которые включали обратную транскрипцию с последующей ПЦР в реальном времени, ИФА, реакцию нейтрализации, титрование вирусов в культуре клеток и на лабораторных мышах, микроскопию и биохимический анализ крови. Работа проведена с вирусами II группы патогенности. В работе были применены методы работы с малыми и крупными лабораторными животными. Все работы выполнены с использованием современного оборудования. Используемые методы подробно описаны в соответствующем разделе текста диссертации.

Положения, выносимые на защиту.

1. Мыши линии BALB/с являются релевантной моделью для изучения острой и персистентной инфекции, вызванной ВПОВ, в зависимости от возраста, а обезьяны *Macaca fascicularis* являются адекватной моделью для изучения начальных этапов формирования иммунного ответа при бессимптомной инфекции.

2. Иммунизация вакциной КЭ обеспечивает длительную защиту от ВКЭ, ВОГЛ, частичную защиту от ВПОВ, но не обеспечивает защиту от ВЗН в экспериментах на мышах. Протективность вакцины КЭ против ВПОВ частично подтверждена на модели приматов вида *Macaca fascicularis*.

3. При экспериментальной инфекции ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ на фоне поствакцинального иммунного ответа к ВКЭ наблюдается эффект предсуществующих АТ, характеризующийся более ранним и более выраженным повышением титров АТ к вакцинному штамму по сравнению с титрами АТ к инфицирующему вирусу. Характер появления перекрёстных противовирусных АТ зависит от индивидуальных особенностей, а также возраста лабораторных животных и сроков после вакцинации.

4. Эффект предсуществующих АТ к ВКЭ значительно снижает возможности дифференциальной серодиагностики переносимых клещами ортофлавивирусных инфекций (ВОГЛ, ВПОВ).

5. Для характеристики ортофлавивирусных вакцин необходимо включать испытания безопасности и протективности в отношении не только специфического вируса, но и в отношении антигенно близкородственных вирусов, учитывая не только летальность, но и заболеваемость и выявление вируса в ЦНС лабораторных животных.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведённого исследования соответствуют областям исследований: пунктам 6, 7, 10 и 11 паспорта специальности вирусология.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных данных подтверждается комплексным подходом к проведению исследований, длительным сроком наблюдений, использованием современных методов и статистической обработкой результатов.

Материалы исследований были представлены на 4-х конференциях: на Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2019», «Ломоносов 2020», «Ломоносов 2022» (Москва 2022), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 2021).

Личное участие автора в получении результатов

Автор провёл анализ научной литературы по исследуемым темам, сформулировал цель и определил задачи исследования, разработал дизайн экспериментов. Результаты, представленные в работе, были получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор провёл статистическую обработку, сформулировал основные положения, выносимые на защиту, и выводы диссертации. Основные публикации по результатам исследования были подготовлены лично автором или при его непосредственном участии. Личный вклад автора в выполнение творческой части исследования составил около 90%.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 4 статьи в зарубежных журналах, индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus, PubMed) и 1 статья в журнале, индексируемом РИНЦ:

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 128 страницах и состоит из введения и 3-х глав основной части диссертации, включая: обзор литературы, материалы и методы, результаты, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, содержащий 227 источников. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 34 рисунками.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ТАКСОНОМИЯ

Ортофлавивирuses принадлежат к семейству *Flaviviridae*. Большинство ортофлавивирuses относится к группе арбовирuses, которая включает возбудители опасных для человека заболеваний. Среди них переносимые комарами: ВДЕН (*Orthoflavivirus dengue*), вирус желтой лихорадки (ВЖЛ, *Orthoflavivirus flavi*), вирус Зика (ВЗИК, *Orthoflavivirus zikaense*), вирус японского энцефалита (ВЯЭ, *Orthoflavivirus japonicum*), ВЗН (*Orthoflavivirus nilense*) и др., а также переносимые клещами: ВКЭ (*Orthoflavivirus encephalitidis*, с 2025 г *Orthoflavivirus zilberi* и *Orthoflavivirus neudoerflense*), ВОГЛ (*Orthoflavivirus omskense*), ВПОВ (*Orthoflavivirus powassanense*), вирус кьясанурской лесной болезни (ВКЛБ, *Orthoflavivirus kyasanurens*) и др. [13,45,46].

1.2 СТРОЕНИЕ ВИРИОНОВ ОРТОФЛАВИВИРУСОВ

Ортофлавивирuses – это оболочечные вирусы размером около 50нм [47] [48]. Вирион состоит из нуклеокапсида, окруженного липидной мембраной, в которую встроено 180 копий белка Е в сочетании с белком М (Рисунок 1 А, Б) [47]. Поверхность вириона состоит из 30 рафтообразных структур, каждая из которых содержит три гетеротетрамера Е-М-М-Е. Каждый гетеротетрамер состоит из двух антипараллельных гетеродимеров Е-М (Рисунок 1 А). В зрелом вирионе белок М находится под димерами белка Е, расположенными параллельно поверхности вириона. Нуклеокапсид состоит из одной копии генома и предположительно из 540 копий капсидного белка С [48]. Нуклеокапсид ортофлавивирuses не является икосаэдрически-симметричным, но каждые три гетеродимера Е-М составляют асимметричную единицу икосаэдрически-симметричного вириона (Рисунок 1 А) [48].

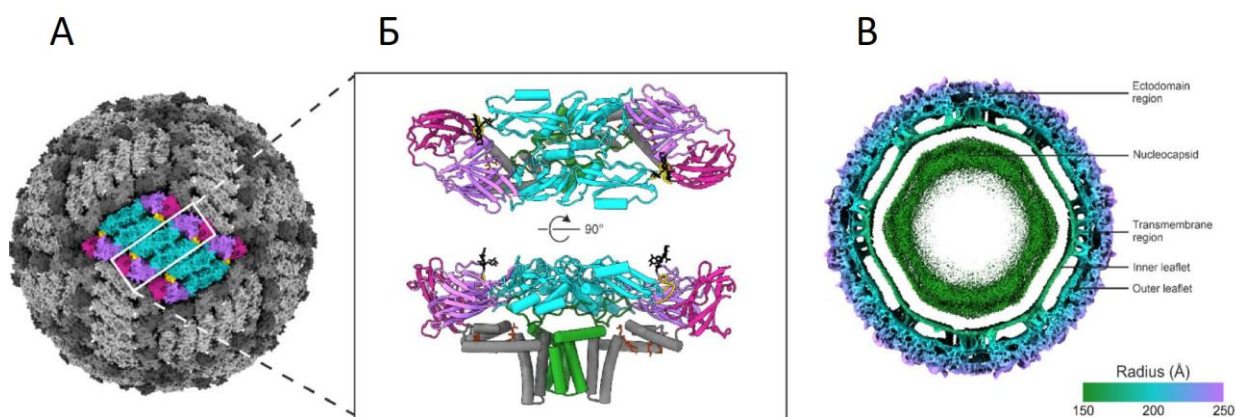


Рисунок 1 – Криоэлектронная реконструкция вириона ВКЭ. (А) Поверхностное представление реконструкции с выделенным слоем из трех гетеротетрамеров Е-М-М-Е. (Б) Увеличенное изображение гетеротетрамера Е-М-М-Е, вид сверху и сбоку. (А, Б) Домен I белка Е окрашен в фиолетовый, домен II - бирюзовый, домен III - пурпурный, домен IV - серый, петля слияния Е окрашена в желтый цвет, мотив N-гликозилирования белка Е (Asn154) - в черный, белок М - зеленый, липиды фосфатидилхолин (ФХ) – оранжевый. (В) Центральный срез радиально окрашенного изображения реконструкции [47]

Геном ортофлавивирусов представлен одноцепочечной РНК (оцРНК) положительной полярности (+оцРНК), имеет одну открытую рамку считывания (ОРС), которая кодирует один полипротеин. Полипротеин процессируется в три структурных белка (С, ргМ, Е) и семь неструктурных белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Рисунок 2). Для ВЗН и ВЯЭ описаны случаи сдвига рамки считывания с образованием новых белков N-NS4B/WARF4 и NS1', соответственно [46,49,50].

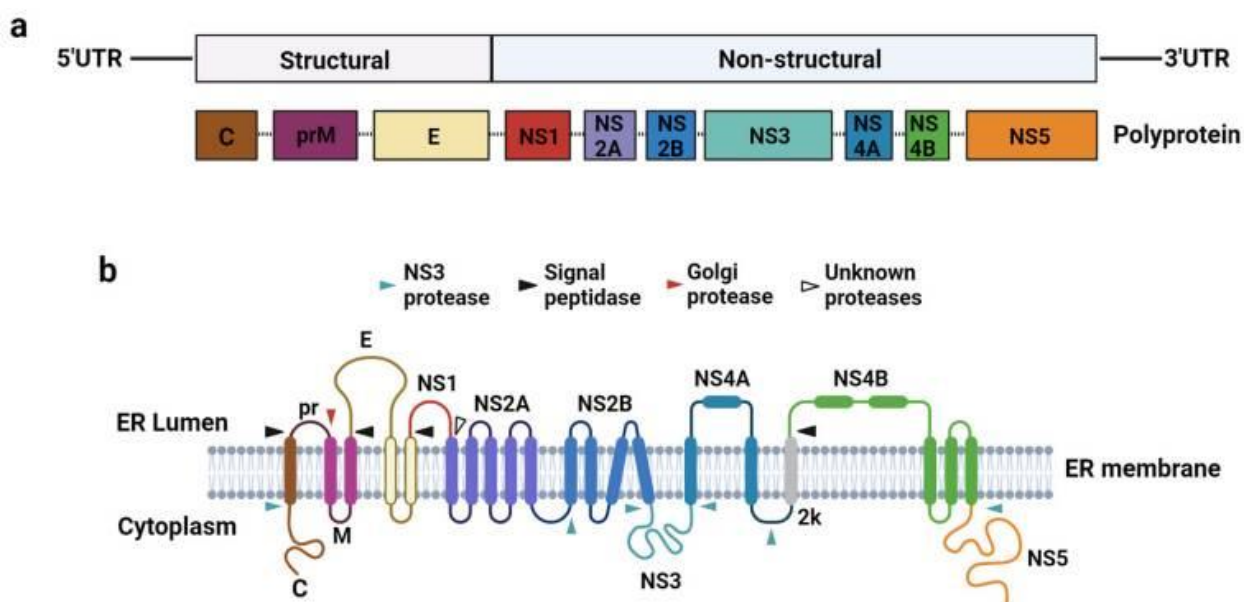


Рисунок 2 – а – ортофлавивирусный геном. б – полипротеин ортофлавивируса, интегрированный в мембрану эндоплазматический ретикулум (ЭПР), с сайтами протеазного расщепления [51]

1.3 Строение и функции структурных белков ортофлавивирусов

Поверхностный белок Е состоит из четырех доменов. Домены I–III состоят преимущественно из β -цепей и образуют эктодомен (sE), покрывающий вирион. Домен I составляет центр эктодомена между доменами II и III и включает единственный сайт гликозилирования ВКЭ Asn154 (Рисунок 1 Б выделен черным). Белки Е большинства штаммов ВКЭ, ВЗН, ВЗИК и ВЯЭ содержат один гомологичный сайт гликозилирования, тогда как у ВДЕН имеется дополнительный сайт гликозилирования Asn67 [52]. Гликозилирование белка Е важно для проникновения, сборки и выхода вируса из инфицированных клеток, а также является фактором вирулентности [53,54]. Домен I расположен между доменами II и III и играет важную роль в жизненном цикле вируса при изменении pH [55].

Домен II белка Е содержит гидрофобную петлю (fusion loop) (рисунок 1 Б, выделен желтым), необходимую для слияния мембран вируса и эндосомы, что обеспечивает доставку вирусного генома в цитоплазму клетки. В зрелом вирионе петля слияния покрыта карманом, образованным доменами I и III соседней молекулы белка Е [56].

Домен III белка Е имеет иммуноглобулиноподобную структуру, которая содержит мотивы связывания с клетками [55]. Антитела, нацеленные на этот домен, с большей вероятностью нейтрализуют вирус, чем те, которые взаимодействуют с другими частями эктодомена. Нейтрализующие антитела, связывающиеся с доменом III, предотвращают конформационные изменения белков Е, вызванные понижением pH в эндосоме, или стерически блокируют связывание с рецептором [56].

Домен IV является α -спиральным мембранно-ассоциированным доменом белка Е и содержит три перимембранных (Е-Н1, Е-Н2 и Е-Н3) и две трансмембранные спирали (Е-TM1 и Е-TM2). Домен IV закрепляет Е-белок в вирусной мембране [56].

Гибкие шарнирные участки между доменами белка Е ортофлавивирусов обеспечивают подвижность поверхности вириона, за счет чего происходит так называемое «вирусное дыхание» [57]. На характер вирусного дыхания могут влиять факторы окружающей среды и свойства вирусных белков [58,59]. В результате вирусного дыхания для нейтрализующих антител открываются эпитопы, недоступные в интактном состоянии, что может влиять на нейтрализацию вируса специфическими антителами [46].

Мембранный белок М имеет небольшой размер и не экспонируется на поверхности зрелого вириона. Белок М расположен между доменами IV белка Е и состоит из N-концевой петли и трех α -спиралей: одной перимембранной спирали (М-Н1) и двух трансмембранных спиралей (М-TM1 и М-TM2) (Рисунок 1 Б). Два белка М и два белка Е образуют

гетеротетрамер, в котором каждый белок М взаимодействует с обоими белками Е. N-концевая петля белка М взаимодействует с доменом II белка Е, а мембранная часть того же белка М взаимодействует с трансмембранным доменом белка Е из того же гетеротетрамера, стабилизируя тем самым димеры белка Е. Внутри клеток белок М существует в виде ргМ (премембранный белок), служит шапероном для белка Е и защищает его от преждевременного слияния с мембраной. В экзосоме, направляющейся из аппарата Гольджи к поверхности мембраны, ргМ расщепляется на рг и М, но рг по-прежнему остаётся на поверхности вириона. Сразу после выхода из клетки протеин рг диссоциирует с поверхности вириона [56].

Капсидный белок С более тщательно изучен для ВДЕН, ВЗИК, ВЗН. Этот белок имеет низкую консервативность аминокислотных последовательностей среди представителей ортофлавириусов, однако имеет схожую структуру. Белок С организован в четыре α -спирали, $\alpha 1$ – $\alpha 4$ (Рисунок 3). Белки С образуют антипараллельные димеры, при этом димеризация происходит в основном между петлями рге- $\alpha 1$ и между спиралями $\alpha 2$ и $\alpha 4$ двух мономеров. Белки С образуют плотный гомодимер благодаря обширным гидрофобным и водородным взаимодействиям. В каждом мономере спирали $\alpha 1$ – $\alpha 3$ собраны в пучок, а два пучка димера образуют гидрофобную поверхность, которая, предположительно, взаимодействует с мембранами клетки. Две спирали $\alpha 4$ димера образуют поверхность, богатую основными аминокислотами, которые связываются с РНК. Связывание РНК с капсидом инициирует образование вирусных частиц, вызывая их агрегацию. Агрегация связанного с мембраной капсида в нуклеокапсидную структуру индуцирует почкование в ЭПР и образование незрелых вирусных частиц. Белок капсида связывается с РНК независимо от последовательности посредством электростатических взаимодействий [48,60].

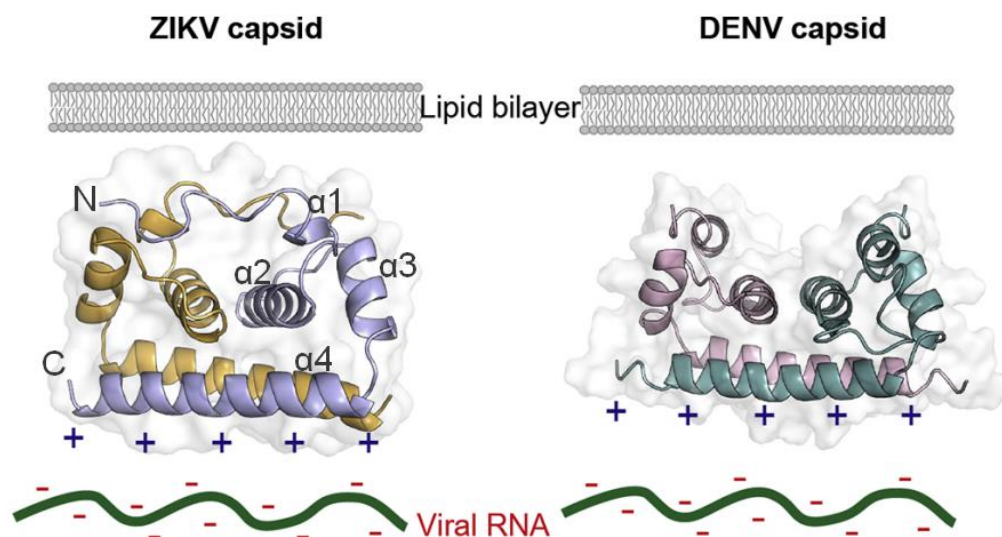


Рисунок 3 – расположение димеров белка С ВЗИК и ВДЕН относительно липидного бислоя и вирусной РНК [61]

1.4 Неструктурные белки ортофлавивирусов

Белок NS1 (~48 кДа) представляет собой многофункциональный гликопротеин, необходимый для репликации вируса, сборки вирионов и ухода вируса от иммунного ответа хозяина [51]. NS1 регулирует образование и активность репликативного комплекса посредством взаимодействия с NS4A, NS4B и промежуточным комплексом NS4A–2K–NS4B [62]. NS1 играет важную роль в патогенезе ортофлавивирусов [49,63]. Это единственный неструктурный белок, секретируемый во внеклеточное пространство, где он участвует в регуляции врожденного иммунного ответа [64]. NS1 выделяется из клеток в виде гексамеров, и в ходе ортофлавивирусной инфекции к этому белку синтезируются АТ [65]. NS1 ВДЕН увеличивает проницаемость сосудов, нарушая эндотелиальный гликокаликс [66]. Антитела к NS1 перекрестно реагируют с широким спектром белков хозяина, такими как факторы свертывания крови человека, интегрины/адгезионные белки, компоненты внеклеточного матрикса. Анализы клеточной адгезии выявили взаимодействие фибронектина с антителами к NS1, что нарушает нормальное функционирование сосудистой системы и может быть причиной сосудистой проницаемости у пациентов с геморрагической лихорадкой денге или синдромом шока денге [67].

NS2A представляет собой гидрофобный трансмембранный белок (~22 кДа). NS2A связывается с 3'НТО вирусной РНК, NS1, NS3 и NS5 с образованием репликативного

комплекса [68]. NS2A также участвует в сборке вириона, связываясь с комплексами белков C-prM-E и NS2B-NS3 [51,62].

NS2B (~14 кДа) является трансмембранным белком, который служит кофактором для сериновой протеазы NS3 [51].

NS3 (~68кДа) является многофункциональным белком. Он состоит из двух основных доменов: N-концевой протеазы и C-концевой хеликазы. С кофактором NS2B NS3 выполняет функции вирусной протеазы. NS2B/NS3 протеаза расщепляет вирусный полипротеин в области капсидного белка, NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A, NS4A-NS2K и NS4B-NS5. NS3 хеликаза необходима для расплетания двухцепочечной РНК (дцРНК) в оцРНК, что создает матрицу для РНК-зависимой РНК-полимеразы NS5 ортофлавивирусов. Хеликазная активность NS3 связана с его взаимодействием с белком NS4A. NS3 также обладает активностью нуклеозид 5'-трифосфатазы (NTPase) и РНК 5'-трифосфатазы (RTPase) [62].

NS4A (~16 кДа) представляет собой трансмембранный белок. Его С-концевой участок содержит сигнальную последовательность, известную как 2К–пептид, который участвует в транслокации NS4B в просвет ЭПР. NS4A локализуется совместно с дцРНК, что предполагает его роль в репликации вирусной РНК [62]. Также было показано, что NS4A ВДЕН и ВЗИК образует олигомеры, которые действуют как каркас для формирования везикулярных пакетов в просвете ЭПР, необходимых для репликации [69]. NS4A ВЗН действует как кофактор для NS3 хеликазы и позволяет поддерживать скорость разматывания вирусной РНК в условиях дефицита АТФ [70].

NS4B (~27 кДа) является крупнейшим мембранно-ассоциированным белком, который также участвует в репликации, взаимодействуя с NS1, NS2B и NS4A и с вирусной РНК. Предполагается, что пятый трансмембранный домен (TM5) белка NS4B участвует в конформационных изменениях и транслоцируется с цитоплазматической стороны на люминальную сторону мембраны ЭПР после расщепления связи NS4B - NS5 вирусной протеазой NS2B/NS3 [51]. NS4A и NS4B ВЗИК также модулируют аутофагию и клеточную дисрегуляцию, чтобы предотвратить гибель клеток, способствуя формированию персистентной вирусной инфекции [71].

NS5 (~100 кДа) состоит из двух основных доменов: метилтрансферазного домена (MTase), расположенного на N-концевой стороне белка, и домена, выполняющего функции РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) – на С-конце. Домен MTase имеет двойную функцию - гуанилтрансферазы (GTase) и метилтрансферазы. Домен RdRp участвует в репликации РНК. Также NS5 является антагонистом интерферонного ответа хозяина. NS5 ВДЕН связывает и разрушает STAT2 через убиквитин-зависимую протеасомную

деградацию. NS5 ВЖЛ ингибирует передачу сигналов IFN-I путем связывания с IFN-активированным фактором транскрипции STAT2 в клетках, которые были стимулированы IFN-I. NS5 ВЯЭ способен ингибировать фосфорилирование TYK2 и STAT1 и ингибировать ядерную транслокацию STAT1, IRF3 и NF-κB, а NS5 ВКЭ - передачу сигналов JAK-STAT и экспрессию IFNAR1 [51,72].

1.5 Жизненный цикл ортофлавивирусов

1.5.1 Прикрепление и проникновение

Жизненный цикл вируса начинается с прикрепления к клетке. Считается, что фактором прикрепления к клеточной поверхности множества вирусов является гепарансульфаты (ГС). Это гликозаминогликаны (ГАГ), которые представляет собой линейные полианионные углеводные цепи и присутствуют на поверхности большинства клеток [73]. ГС служат первичными молекулами прикрепления, которые концентрируют вирусные частицы на поверхности клетки и могут способствовать последующему связыванию со специфическим рецептором [73,74]. На данный момент наиболее изучены рецепторы для ортофлавивирусов, переносимых комарами. Сообщается о нескольких предполагаемых рецепторах, участвующих во взаимодействии ортофлавивирусов с клетками: GRP78 (глюкозорегулируемый белок 78), Hsps (белки теплового шока) 70 и 90, клаудин-1, CLEC5A (член семейства доменов C-типа лектина 5 типа A), DC-SIGN (межклеточный адгезионный белок-3-захватывающий неинтегрин), L-SIGN (специфичный для печени/лимфатических узлов неинтегриновый белок захватывающий ICAM-3) [75]. Для ортофлавивирусов, переносимых клещами, специфические рецепторы менее изучены. Однако, было предложено два кандидата рецепторов для ВКЭ в клетках млекопитающих: ламинин-связывающий белок (LBP) и интегрин $\alpha V\beta 3$ [76,77], и показана роль LRP8 (рецептора аполипопротеина E и рилина с высокой экспрессией в головном мозге), как рецептора для ВКЭ в головном мозге [78]. После распознавания рецептора или комплекса рецепторов, вирусная частица интернализуется различными путями, которые включают клатрин-опосредованный эндоцитоз, неклассический динаминзависимый эндоцитоз или макропиноцитоз, в зависимости от серотипа вируса и типа клетки [79–81].

Альтернативный путь проникновения вируса в клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы, происходит посредством взаимодействия иммунного комплекса вирион-АТ с этими рецепторами, что может вызывать антитело-зависимое усиление инфекции (ADE) (Рисунок 4). Наиболее подробно ADE было изучено на ВДЕН, для которого этот феномен доказан эпидемиологически [36,37]. ADE связано с наличием ненейтрализующих или

нейтрализующих АТ в субнейтрализующих концентрациях, выработанных при первичном заражении гетерологичным серотипом ВДЕН. Это явление не ограничивается серотипами ВДЕН, и усиление может быть опосредовано антителами к гетерологичным ортофлавивирусам [32,34].

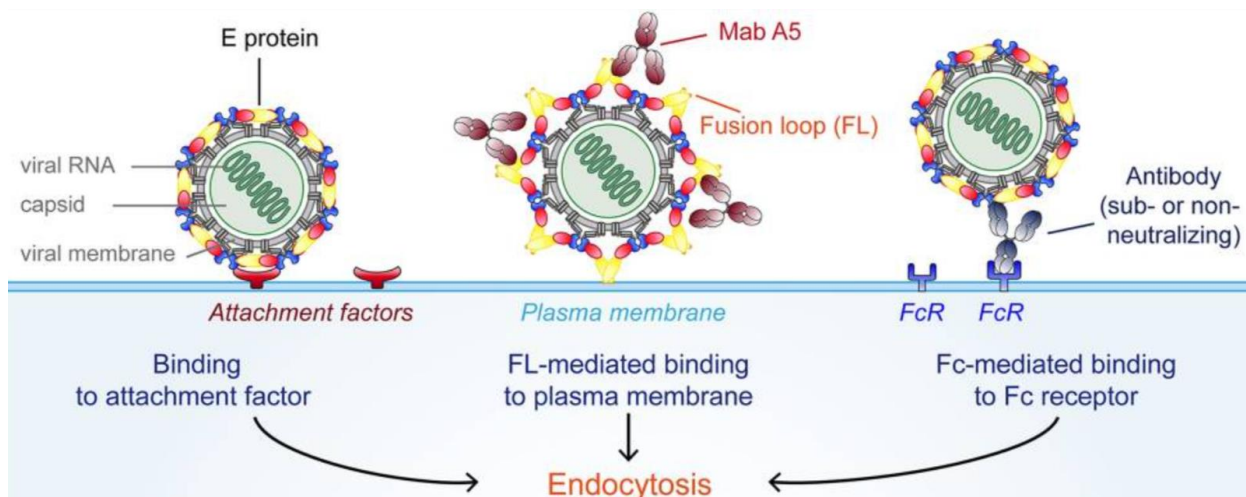


Рисунок 4 – Показаны три различных способа интернализации ортофлавивирусов. Слева: связывание со специфическим рецептором. В центре: индуцированное МАТ взаимодействие петли слияния с мембраной. Справа: АДЕ [82]

На примере ВКЭ, *in vitro*, был показан ещё один способ проникновения в клетку – АДЕ, независимое от наличия Fc-рецептора: взаимодействие моноклонального антитела (МАТ) А5, которое распознает эпитоп на границе димеров белка Е, приводит к диссоциации димера белка Е и экспонированию петли слияния при нейтральном значении рН, обеспечивая прямое взаимодействие поверхностного белка Е с плазматической мембраной клетки (Рисунок 4) [82].

По мере снижения рН в эндосоме клетки протоны взаимодействуют с аминокислотными остатками белка Е, в частности с гистидинами, которые у ряда ортофлавивирусов расположены в 146 и 323 аминокислотной позиции белка Е (His 146 и His 323). Протонирование этих остатков, особенно His323, приводит к дестабилизации гетеротетрамера и обнажает петли слияния поверхностных белков [83,84]. Петли слияния внедряются в мембрану эндосомы, белки Е тримеризуются, и начинается процесс слияния клеточной и вирусной мембран (Рисунок 5). После образования поры нуклеокапсид выходит в цитоплазму клетки [48]. В цитоплазме он распадается и высвобождает вирусную РНК. События, ответственные за снятие белка С с РНК ВКЭ, не выяснены, но для ВДЕН было показано, что диссоциация нуклеокапсида требует убиквитинирования капсидного белка [85].

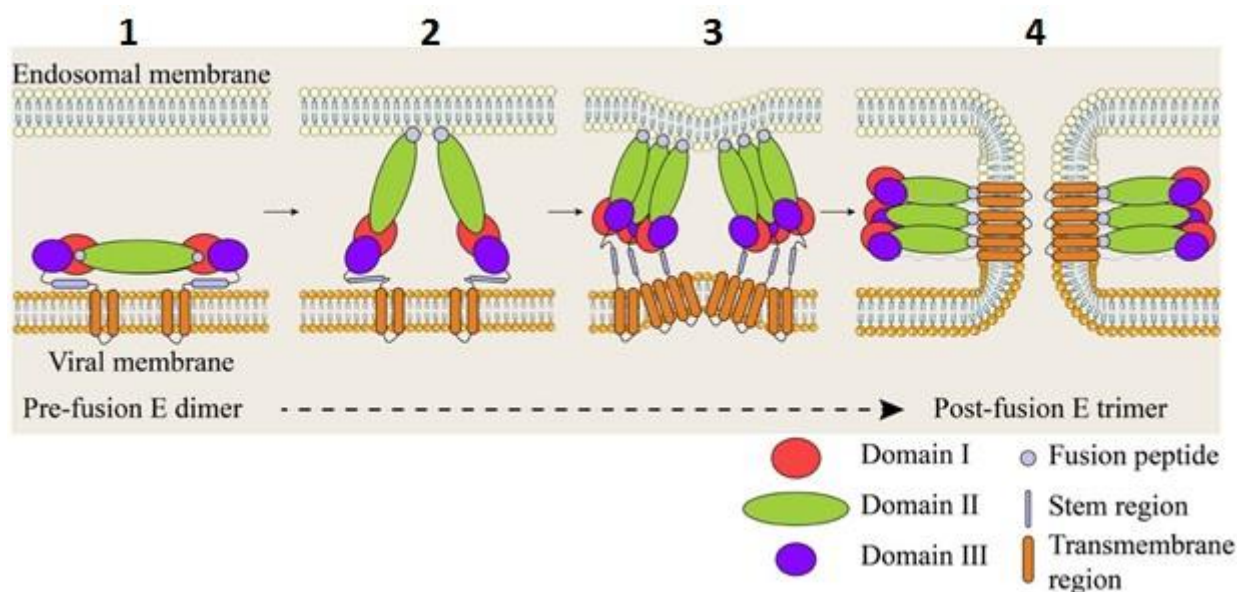


Рисунок 5 – Слияние вирусной и клеточной мембран в эндосоме. 1 – зрелый вирион в эндосоме. 2 – ориентация петли слияния белка Е к эндосомальной мембране в условиях понижения рН и внедрение петли слияния в мембрану. 3 - Домен III смещается и вращается, создавая коровый тример, С-концевая часть белка Е сгибается в обратную от петли слияния сторону, заставляя мембрану изгибаться. 4 - Формирование окончательной постфузионной структуры и открытие поры слияния [55]

1.5.2 Трансляция и репликация вирусного генома

Защита от распознавания и деградации вирусной РНК в цитоплазме обеспечивается 2'-О-метилированием вирусного генома и наличием кэпа на 5'-конце [46]. Синтез полипротеина происходит в ассоциации с мембранами ЭПР. Инициация трансляции усиливается структурами 3'UTR и кэп-структурой, которую распознаёт эукариотический фактор инициации трансляции 4F (eIF4F) [86,87]. Кэп-структуру eIF4F соединяет с субъединицей рибосомы 40S и связанными с ней факторами, затем она сканирует 5'UTR до тех пор, пока не достигнет стартового кодона AUG. При обнаружении AUG 40S рибосомой, присоединяется субъединица рибосомы 60S и начинается элонгация трансляции с помощью фактора eEF2 [88]. Как только рибосома 80S встречает стоп-кодон начинается терминация трансляции, которая происходит с помощью факторов eRF1 и eRF3 [89]. Эти факторы катализируют высвобождение полипептидной цепи, разборку и рециркуляцию рибосомы [89].

1.5.3 Процессинг вирусного полипротеина

Процессинг ортофлавивирусного полипротеина происходит при помощи клеточных и вирусных протеаз. Расщепление между С и рgМ требует двух этапов, при которых вирусная протеаза NS3/NS2B расщепляет белок С со стороны цитозоля, а клеточная сигналаза – в просвете ЭПР. Это приводит к высвобождению зрелого белка С в цитозоль и

оставляет небольшую часть незрелого белка С в мембране ЭПР. Процессинг между ргМ-Е, Е-NS1 и NS1–NS2A опосредован клеточными ферментами и не требует вирусной протеазы. Сайты расщепления NS2A–NS2B и NS2B–NS3, опосредуются белком NS3 в цис-положении, а процессинг между NS3–NS4A и NS4B–NS5 опосредован NS3/NS2B в трансположении. Зрелые белки NS4A и NS4B образуются путем расщепления в двух сайтах NS3/NS2B и клеточной сигнализацией, оставляя встроенный в мембрану 2К пептид (Рисунок 3b) [46].

Важную роль в процессинге играют трансмембранные домены (ТМД) белков С, ргМ и Е. Первый транслируемый белок С закрепляется на мембране ЭПР с помощью С-концевого ТМД, который также называют сигнальной последовательностью или 1К пептидом и служит сигналом для транслокации ргМ в просвет ЭПР. ТМД1 и ТМД2 белков ргМ и Е служат сигналами остановки переноса и внутренними сигнальными последовательностями для последующих гликопротеинов, соответственно. Взаимодействия ТМД белка Е необходимы для эффективного слияния мембран во время проникновения вируса, а также способствуют эффективному производству и высвобождению инфекционных вирусных частиц и могут участвовать в рекрутировании нуклеокапсида [90,91].

Особое значение для жизненного цикла ортофлавириусов также имеет последовательность протеолитических расщеплений, которые происходят по обе стороны от сигнальной последовательности 1К в вирусном полипротеине. Показано, что высвобождение зрелого белка С на цитозольной стороне мембраны ЭПР вызывает изменения на люменальной поверхности ЭПР, что способствует эффективному сигналазному отщеплению ргМ. Результатом последовательных событий является задержка накопления ргМ, что способствует эффективному включению нуклеокапсида в почкующиеся вирионы [92].

1.5.4 Репликация

После трансляции неструктурные вирусные белки стимулируют инвагинацию мембраны ЭПР и образуют репликативные комплексы (РК). РК включает вирусную РНК, неструктурные вирусные белки, клеточные факторы и представляет собой углубления в мембране ЭПР с небольшой порой, через которую могут проникать клеточные факторы и выходить готовые РНК. Важным фактором в репликации вирусной РНК является циклизация геномной РНК благодаря высококонсервативным вторичным структурам на 5'- и 3'-UTR оцРНК [93]. Геномная (+)РНК сначала используется в качестве матрицы, на которой RdRp синтезирует комплементарную (-) цепь РНК, в результате чего образуется

репликативная промежуточная форма – дцРНК. Затем (-)РНК служит матрицей для избыточного производства геномной (+)РНК. Соотношение (-)РНК к (+)РНК примерно 1:10 [94]. Хеликаза NS3 специфически связывается с консервативными последовательностями на 5'UTR 5'-AGUUGUUAGUCU-3', разделяя дцРНК на одноцепочечную форму в направлении 3'-5', чтобы разделить созданный вирусный геном и отрицательный геном, который снова используется в качестве матрицы для следующего раунда синтеза вирусного генома [94]. Важным для инициации синтеза РНК является то, что 5'- и 3'-концы генома находятся в непосредственной близости. В таком положении NS5, который связан с 5'-концом, находится вблизи 3'-конца геномной РНК, который является местом инициации синтеза РНК [95].

1.5.5 Сборка и выход вирусных частиц

После процессинга зрелые белки С находятся в непосредственной близости от РК [96]. Вновь синтезированная РНК выходит из РК и связывается с $\alpha 4$ спиралями С-белка, формируя нуклеокапсид. Собранные нуклеокапсиды приобретают свои липидные оболочки с поверхностными белками ргМ и Е путем отпочкования в просвет ЭР. Однако почкование может происходить и без присутствия нуклеокапсида, поскольку совместная экспрессия ргМ и Е может инициировать почкование вируса в отсутствие других вирусных белков или геномов с образованием вирусоподобных частиц [48].

После сборки вирионы представляют собой незрелые вирусные частицы, в которых белок Е расположен в виде тримеров вокруг шипа ргМ. Созревание ортофлавириусов начинается при воздействии кислой среды в транс-Гольджи и сети Гольджи. Понижение рН запускает конформационную перестройку ргМ и Е, которая делает ргМ доступным для расщепления клеточной протеазой фурином, образуя белок М и пептид рг, который остается связанным с вирусной оболочкой при кислом рН и продолжает предотвращать преждевременное слияние вирусной и клеточной мембран. При выходе из клетки вирус попадает в нейтральную среду, что вызывает диссоциацию рг-пептида с поверхности вируса, и это приводит к образованию инфекционной зрелой вирусной частицы [46].

1.6 Экология и эпидемиология

Среди переносимых клещами ортофлавириусов наиболее распространенным является ВКЭ, который эндемичен для стран Европы и Азии [97]. В мире ежегодно регистрируется около 12 тыс. случаев заболевания КЭ [98]. В России на территориях, где распространен ВКЭ, проживает более 60 млн человек [98]. Также отмечается, что ареал ВКЭ с годами увеличиваются [9]. ВКЭ разделяют на три основных подтипа европейский,

сибирский и дальневосточный. В последнее время выделяют ещё два байкальских, гималайский и боснийский подтипы ВКЭ [99,100]. Однако с 2025 года ВКЭ поделён на два вида *Orthoflavivirus neudoerflense*, который включает европейский подтип, и *Orthoflavivirus zilberi* – для всех остальных подтипов [45]. Считается, что разные подтипы отличаются тяжестью течения инфекции, хотя изменчивость аминокислотных последовательностей полипротеина невелика: до 2,2% внутри и до 5,6% между подтипами [101]. Для всех подтипов вируса характерны лёгкие и тяжёлые случаи КЭ, а по наличию АТ к ВКЭ у здорового невакцинированного против КЭ населения выявляют бессимптомные инфекции. Тем не менее европейский подтип связан с неврологическими последствиями у 10% пациентов и с уровнем летальности 0,5–2%, у большого числа пациентов с сибирским подтипом отмечается более длительное течение инфекций с уровнем летальности 2–3% и с возможным переходом инфекции в хроническую форму, дальневосточный подтип ассоциируется с более тяжелым течением и большей частотой неврологических осложнений и до 17% случаев заканчивается летальным исходом [23,102].

Заражение ВКЭ чаще всего происходит трансмиссивно при присасывании клеща. Основными переносчиками ВКЭ являются клещи *Ixodes ricinus* и *Ixodes persulcatus*, хотя и другие клещи могут участвовать в циркуляции вируса и инфицировать человека при присасывании. Возможен и алиментарный путь заражения - при употреблении непастеризованных молочных продуктов от инфицированных домашних животных [1].

ВОГЛ распространён в Курганской, Тюменской, Омской и Новосибирской областях, но последние сообщения о том, что ВОГЛ был выявлен в Казахстане и Кемеровской области РФ, может свидетельствовать о расширении ареала этого вируса [11,12]. В 1988-1997 годах в России было зарегистрировано 165 случаев заражения, однако это, вероятно, не полная информация о заболеваемости, так как бессимптомные случаи или случаи с легким течением, вероятно, не регистрировались. Напряженность иммунитета к вирусу ВОГЛ в эндемичных районах также неизвестна ввиду отсутствия соответствующих тест-систем [103,104]. Таким образом, современная статистика заболеваемости вирусом ВОГЛ неясна.

Генетическое разнообразие ВОГЛ предполагает как минимум три подтипа [105]. Для инфекции ВОГЛ возможен трансмиссивный путь передачи. Переносчиками вируса являются клещи *Dermacentor reticulatus* и *Dermacentor marginatus*. Однако, человек в основном заражается при охоте и разделке туш инфицированных ондатр, при контакте с мочой, фекалиями или кровью животных [104]. Также имеется возможность алиментарного пути заражения [104,106].

ВПОВ генетически неоднороден и состоит из двух линий. Линия I включает непосредственно вирус ВПОВ, который распространён в Канаде, США и на Дальнем Востоке России [107]. К линии II относится вирус оленьего клеща (ВОК), распространённый в Канаде и США [108]. Серологически линия I и II не различимы, но генетически и экологически отличаются [109]. Переносчиками ВПОВ в США являются клещи *Ixodes cookei*, *Ixodes marxi* и *Ixodes scapularis*. В США с 1958 по 2021 гг. было зарегистрировано 273 случая инфекции [110]. В России переносчиками ВПОВ являются клещи *I. persulcatus* и *Haemaphysalis concinna*. Истинное количество случаев заболеваний, связанных с ВПОВ, трудно оценить из-за схожего течения инфекции с КЭ и отсутствия соответствующих тест-систем. На территории Дальнего Востока имеются сочетанные очаги ВПОВ и ВКЭ, что делает возможным смешанную инфекцию сразу двумя вирусами. Ранее было показано, что смешанная инфекция возможна и высказывались предположения о более тяжелом течении инфекции при одновременном заражении этими вирусами [15].

Первые сообщения о ВЗН появились в 1937 г в Уганде, а на сегодняшний день вспышки инфекции или выделение вируса из комаров, птиц, людей регистрируются в Северной и Южной Америке, Европе, Азии, Австралии, Африке [111,112]. ВЗН способен к быстрому распространению, с момента первых сообщений инфицирования людей в США в 1999 году ВЗН распространился по всей Северной и Южной Америке менее чем за 10 лет [113]. С 2011 по 2021 г в США было зарегистрировано 24 741 случаев инфекции ВЗН у человека [114]. С 2020 по 2024 в Европе было зарегистрировано более 1823 случаев инфицирования [115]. В России первые случаи заболеваний лихорадкой Западного Нила зарегистрированы в конце 1960-х годов в Астраханской области. В 1998-1999 г произошла крупная эпидемическая вспышка, насчитывающая 475 зарегистрированных случаев, в Волгоградской и Астраханской областях. Всего с 1998 по 2020 в России зарегистрировано 2964 случая, а граница распространения ВЗН не поднималась севернее Тульской области [116]. В 2021 г вспышка ВЗН была зарегистрирована на территории Московской агломерации, при которой у 26 пациентов наблюдались клинические проявления заболевания, которые привели к двум летальным исходам [117]. Инфекция ВЗН представляет собой серьезную угрозу особенно для людей с иммунодефицитом и пожилых людей.

Филогенетические исследования генома ВЗН указывают на существование 9 линий вируса, но заболевания у людей и животных в основном связаны с линией 1 и 2 [118]. В России в последнее время причиной заболевания в большей мере является линия 2 ВЗН [119]. Основным резервуаром ВКЭ являются птицы и комары. Людям ВЗН передается

обычно комарами рода *Culex*, но также предполагается алиментарный путь заражения, возможна вертикальная передача и через грудное молоко [120].

1.7 ПАТОГЕНЕЗ И КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА

1.7.1 Клещевой энцефалит

ВКЭ является нейротропным вирусом, вызывает клещевой энцефалит (КЭ), для которого характерно двухфазное течение инфекции. От присасывания клеща до проявления первых симптомов КЭ проходит в среднем 8 дней (4-28). При присасывании клещ вирус минует первый защитный барьер, кожу, и со слюной клеща попадает в подкожные слои. В месте присасывания вирус реплицируется в дендритных клетках (ДК), нейтрофилах кожи, которые переносят вирусные частицы в дренирующие лимфатические узлы. Репликация вируса в лимфатических узлах приводит к распространению вируса в кровоток и первой вирусемической фазе, которая длится от 2 до 10 дней и проявляется, как гриппоподобное состояние: лихорадка, повышенная утомляемость, боль в теле и головная боль. Для первой фазы характерна лейкопения, тромбоцитопения [121]. В это время вирус сталкивается с иммунным ответом, который был запущен самой инфекцией, и как правило на этой стадии инфекция заканчивается с появлением противовирусных антител.

Если инфекция не остановилась, наступает бессимптомный период продолжительностью от 1 до 21 дня, во время которого вирус попадает в периферические органы и ткани. После чего наступает вторая стадия вирусемии, при которой вирус проходит через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в ЦНС [1,122]. Для второй фазы описано несколько форм с разным уровнем поражения ЦНС, от лихорадки до менингита, менингоэнцефалита, менингоэнцефаломиелита, энцефалорадикулита. Острый КЭ характеризуется появлением тяжёлых неврологических симптомов, которые включают, головную боль, изменённое сознание, сенсорные нарушения, судороги, атаксию, тремор, дисфагию, парезы, паралич дыхательных мышц, дыхательную и сердечно-сосудистую недостаточность, сильные боли в спине и конечностях [21,122]. Во вторую фазу в ликворе выявляют умеренный плеоцитоз, мононуклеарные клетки сменяют полиморфноядерные, часто повышается уровень альбумина [123]. Перенесенное тяжёлое заболевание КЭ приводит к резкому ухудшению качества жизни. При наблюдении пациентов в течение 12 месяцев после выздоровления фиксировали головную боль, нарушение концентрации внимания, ухудшение памяти, эмоциональную нестабильность, потливость, дисфагию, атаксию, тремор, потерю слуха [122]. У детей тяжелое течение болезни встречается реже, чем у взрослых, однако для них также характерен длительный постэнцефалитический

синдром [122]. В зависимости от подтипа ВКЭ вирус летальность варьируется от 0,5% до 40% [23].

1.7.2 Омская геморрагическая лихорадка

Инфекция, вызванная ВОГЛ, также может протекать двухфазно. Инкубационный период длится в среднем 3-7 дней. Продромальный период может проявляться ломотой в теле и недомоганием. Затем наблюдается непрерывная лихорадка с температурой тела 39-40°C, которая может сопровождаться такими симптомами как головная боль, кашель, боль в мышцах, обезвоживание, желудочно-кишечные симптомы, различные кровотечения (из носа, рта, маточные, кожные). В первые дни заболевания отмечаются различные клинические признаки: артериальная гипотензия и брадикардия, гиперемия лица, шеи и молочных желез, гнилостный запах изо рта, сухость на языке, яркий цвет и отек слизистой оболочки рта и горла, увеличение печени, лицо становится одутловатым, появляются трещины и корки на губах. Эти признаки ухудшаются в течение первых 3-4 дней с начала первых симптомов, особенно это характерно для гиперемии [104]. Через 1-2 недели после начала симптомов заканчивается первая фаза заболевания, 50-70% больных выздоравливают без каких-либо осложнений. В 30-50% случаях к третьей неделе клинического заболевания начинается вторая фаза. Эта фаза длится 5-14 дней, характеризуется лихорадкой и повторным появлением первичных симптомов, появляется петехиальная сыпь, синяки в местах надавливания. В анализе крови наблюдается лейкопения, тромбоцитопения и плазмоцитоз. Часто поражаются внутренние органы, особенно легкие и почки. Появляются симптомы энцефалита, которые обычно уходят вместе с другими симптомами второй фазы [11,104]. Как правило инфекция ВОГЛ заканчивается полным выздоровлением, но в редких случаях может развиваться выпадение волос, потеря слуха, ухудшение памяти и концентрации внимания. В летальных случаях пациенты умирают после стремительного развития геморрагического синдрома [104]. Летальность при ОГЛ колеблется от 0,5 до 2,5% [104].

1.7.3 Лихорадка Повассан

Инфекция ВПОВ имеет схожее течение с КЭ. Инкубационный период при инфекции ВПОВ длится от 8 до 34 дней. Первые симптомы не специфичны, так как для них характерна лихорадка, головная боль, сонливость, боль в горле, дезориентация, тошнота [124]. В тяжелых случаях заболевания эти симптомы развиваются до менингита, энцефалита, менингоэнцефалита. Для острой фазы, вызванной ВПОВ, характерна рвота, респираторный дистресс-синдром, судороги, лихорадка, затруднение речи, атаксия, тремор,

спутанность сознания, вялость, параличи, часто гемиплегия. Заболевание может привести к отёку головного мозга, коме и в 10% случаев смерти. В большинстве летальных случаев при вскрытии головного мозга наблюдается периваскулярная и паренхиматозная воспалительная инфильтрация. В случае выздоровления у 50% пациентов наблюдаются длительные неврологические последствия: повторяющиеся головные боли, истощение мышц, проблемы с памятью [124,125].

После укуса клеща ВПОВ инфицирует макрофаги и фибробласты кожи. Сообщалось, что макрофаги являются основной мишенью для ВПОВ в селезенке. В ЦНС, было показано, что нейроны являются основной мишенью как у мышей, так и у людей [126].

1.7.4 Лихорадка Западного Нила

Заражение ВЗН происходит через укус инфицированного комара. Слюна комара попадает под кожу, где вирус инфицирует дендритные клетки, которые перемещаются в дренирующие лимфатические узлы. Вскоре после этого начинается виремия, вирус распространяется по тканям и периферическим органам, включая селезенку, печень и почки. Было показано, что через 8 дней после появления первых симптомов заболевания, ВЗН может быть обнаружен в моче. Затем наступает следующая стадия – проникновение в ЦНС [113].

Инкубационный период ВЗН составляет примерно от 2 до 15 дней. Симптоматическая инфекция ВЗН у большинства пациентов протекает в легкой форме, иногда сопровождающейся головной болью, миалгией, тошнотой и рвотой, а также ознобом. У некоторых пациентов кратковременно появляется папулезная сыпь на руках, ногах или туловище. Болезнь обычно длится менее семи дней. Однако у ряда больных в период выздоровления наблюдается сильная утомляемость и недомогание. Примерно у 5% пациентов развиваются неврологические заболевания, которые включают менингит, энцефалит и полиомиелитоподобный синдром [127]. Энцефалит и/или менингит, вызванный ВЗН, характеризуются быстрым началом головной боли, светобоязнью, болями в спине, спутанностью сознания и постоянной лихорадкой. Полиомиелитоподобный синдром ВЗН проявляется острым вялым параличом, острым началом асимметричной слабости и отсутствием рефлексов без боли [113]. Смертность после нейроинвазивной инфекции составляет около 10% [128].

1.8 ВНЕШНИЙ ПУТЬ СвёрТЫВАНИЯ КРОВИ

Геморрагические ортофлавивирусные лихорадки связаны с повышением проницаемости сосудов, повреждением печени и с нарушением свёртывания крови.

Различают внешний и внутренний путь свертывания крови. Во внутреннем механизме принимают участие только компоненты крови. К факторам внутреннего пути относятся VIII, IX, XI и XII (Рисунок 6). Факторы II, V и X рассматриваются, как факторы общего пути свертывания. Также важными компонентами свёртывания крови являются ионы кальция и фосфолипиды. Внешний и внутренний пути отличаются природой инициирующих свертывание ферментных комплексов, но далее они образуют общий путь, который заканчивается активацией ф. X, образованием тромбина с последующим преобразованием фибриногена в фибрин [129].

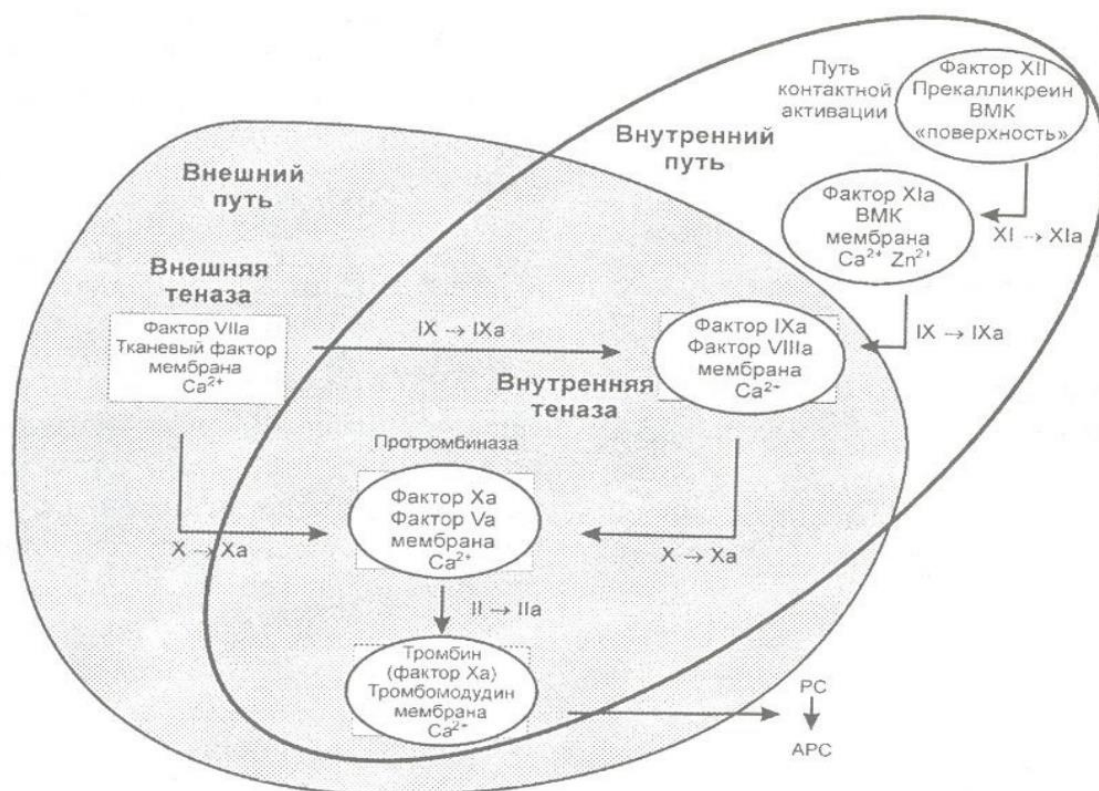


Рисунок 6 – Ферментативный каскад свертывания крови с выделением внешнего и внутреннего пути свертывания крови [129].

Параллельно функционирует внешний путь свертывания, в котором задействованы как компоненты крови, так и другие факторы. При этом основными компонентами внешнего пути является фактор VII (проконвертин) и тканевый фактор (ТФ, тромбопластин) [129]. Фактор VII синтезируется в печени, а в плазме его концентрация составляет приблизительно 0,5 мкг/мл и только 0,5% от общего количества находится в активированной форме [129]. ТФ экспрессируют клетки практически всех тканей организма, за исключением эндотелия и клеток крови в состоянии покоя [130]. Благодаря своей рецепторной активности для фактора VII, ТФ является первичным инициатором каскада коагуляции крови и обеспечивает быстрое восстановление гемостаза в случае

повреждения органов. Воспалительные цитокины, такие как TNF- α или интерлейкины, индуцируют синтез ТФ в эндотелиальных и клетках крови, что приводит к повышению уровня циркулирующих молекул ТФ [131,132]. В кровотоке ТФ связывается с фактором VII. Образованный комплекс ТФ/VII запускает каскад реакций, в результате которых происходит активация фактора VII и других факторов, относящихся к общему пути свертывания крови, что приводит к образованию фибрина [131].

Одним из методов определения нарушений в гемостазе, в частности для характеристики внешнего пути свертывания крови, используют метод определения протромбинового времени (ПВ). В ряде исследований по изучению механизмов коагуляции у пациентов с геморрагической лихорадкой денге было показано, что часто ПВ увеличивается [133]. Это связывают с повреждением печени и/или переменным снижением активации факторов (II, V, VII, X), связанных с внешним или общим путём свертывания крови [129,134]. Эти исследования были проведены на людях во время госпитализации с тяжелыми клиническими проявлениями. Также повышение ПВ может быть связано с дефицитом витамина К, приемом антикоагулянтов, ДВС-синдромом (фаза гипокоагуляции), афибриногенемией, гипофибриногенемией, дисфибриногенемией, заболеваниями печени, злокачественными опухолями. Укорочение протромбинового времени может быть связано с активацией внешнего и общего путей свертывания или ДВС-синдромом (фаза гиперкоагуляции)[129].

1.9 ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ОРТОФЛАВИВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

1.9.1 Врожденный иммунный ответ

Внутриклеточный иммунный ответ при КЭ инициируется распознаванием молекулярных паттернов, ассоциированных с патогенами (pathogen-associated molecular patterns - PAMP), которые представляют собой консервативные белки или молекулы, специфичные для патогена [1]. Рецепторы, которые их распознают называются патоген распознающими рецепторами (ППР). При ортофлавивирусной инфекции наиболее важными ППР являются TLR3 (Toll-like receptor 3 - Toll-подобный рецептор 3), TLR7, TLR8, RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1 - индуцируемый ретиноевой кислотой ген I), MDA-5 (melanoma differentiation-associated protein 5 - ассоциированный с дифференцировкой меланомы белок-5). TLR3, RIG-I, MDA-5 способны распознавать дцРНК, которая образуется в качестве промежуточного продукта во время репликации ортофлавивируса. TLR7 и 8, расположенные в эндосомах, распознают оцРНК ортофлавивируса. RIG-I распознаёт 5'-фосфорилированную оцРНК в цитоплазме [126].

После распознавания PAMP PPP активируют адаптерные молекулы. TLR3 и TLR4 передаёт сигнал TRIF (TIR-домен-содержащий адаптер-индуцирующий интерферон- β), TLR7 и 8 рекрутируют первичный ответ миелоидной дифференцировки 88 (Myd88), RIG-I и MDA -5 передают сигнал стимулятору промотора интерферона-бета-1 (IPS-1), также известному как митохондриальный противовирусный сигнальный белок (MAVS), вирус-индуцированному сигнальному адаптеру (VISA) и адаптеру CARD, индуцирующему экспрессию гена IFN- β . MyD88 взаимодействует с IRF4, IRF5 и IRF7, которые транслоцируются в ядро и регулируют экспрессию клеточных генов. IRF7 необходим для индукции гена IFN типа I по Myd88-зависимому пути. В TRIF-зависимом пути важную роль индукции гена IFN типа I играет IRF3. IRF5 необходим для индукции генов провоспалительных цитокинов. IRF взаимодействуют с другими факторами транскрипции, такими как NF- κ B, и эти взаимодействия определяют специфичность и уровень транскрипции, которые индуцируются активацией PPP [126,135,136].

После секреции IFN I типа сигнализирует аутокринным и паракринным образом, связываясь с гетеродимерным рецептором IFN (IFNAR1 и 2). Связывание IFN активирует тирозинкиназы Jak1 и Tyk2, которые затем фосфорилируют активатор белков транскрипции STAT1 и STAT2, что приводит к активации и транслокации стимулируемого интерфероном генного фактора 3 (ISGF3) в ядро. Это приводит к экспрессии белков ИФН-стимулируемых генов [137]. Было показано, что ВКЭ способен уходить от иммунного ответа, нарушая синтез ИФН при воздействии белка NS5, который препятствует фосфорилированию Jak1 и Tyk2 и последующему фосфорилированию STAT1/2 [138]. Кроме того, было показано, что NS5 блокирует транспортировку и созревание субъединицы IFNAR1 на плазматической мембране [139].

На данный момент для ВКЭ хорошо изучены два противовирусных ИФН-стимулируемых гена белка TRIM79 α и ассоциированный с ЭПР вирус-ингибирующий белок (виперин). TRIM79 α ограничивает репликацию ВКЭ, опосредуя лизосомальную деградацию белка NS5. TRIM79 α специфичен для ВКЭ, поскольку не распознаёт NS5 ВЗН [140]. Виперин при воздействии инфекции, вызванной ВКЭ, способен ингибировать репликацию +одРНК, взаимодействуя с вирусным белком NS3 и разрушая его через протеасому, и препятствует сборке вируса, взаимодействуя с клеточным белком аппарата Гольджи брефельдином А - резистентным фактором обмена гуаниновых нуклеотидов 1 (GBF1). Такое взаимодействие может быть причиной высвобождения капсидных частиц из клеток [141].

Исследования экспрессии цитокинов и хемокинов в ответ на ортофлавирусную инфекцию в основном получены с использованием сывороток или спинномозговой

жидкости инфицированных людей на стадии госпитализации, что обычно соответствует второй фазе инфекции, или при экспериментальном заражении лабораторных животных. Литературные данные по биомаркерам инфекций, вызванных ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ и ВЗН у людей и лабораторных мышей представлены в таблице 1.

Таблица 1 – биомаркерам инфекций, вызванных ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ и ВЗН у людей и лабораторных мышей

		Люди	Мыши
При ВКЭ	Сыворотка	IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17A, IL-17F, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , MMP-9, HMGB-1, TLR-2 CXCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CCL2, CCL3, CCL7, [142] [143]	IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-10, IFN- α , IFN- γ , CXCL9, CXCL10, CXCL1/KC, CXCL2, CCL2/MCP-1, G-CSF, [144] [6]
	ЦНС	IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17F, IL-22, CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CCL2, CCL3, CCL7, CCL5/RANTES, MMP-9, S1P, HMGB-1 [145] [143]	IL-2, IL-6, IL-10, IFN γ , TNF- α [146]
При ВОГЛ	Селезёнка	нет данных	IL-1 α , IL-12p70, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β CCL5 [147]
	ЦНС	нет данных	нет данных
При ВПОВ	Сыворотка	нет данных	GM-CSF, IL-2, IL-5, IL-13, RANTES [148]
	ЦНС	нет данных	IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ , TNF α , TGF β [44] CX3CR1[148]
При ВЗН	Сыворотка	IL1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL2, CCL4, GM-CSF [149,150]	IL-6, IL-12p70, IL-22, IL-31, IFN- γ , TNF- α , CXCL1, CXCL2, CXCL10, CCL2, CCL7, CCL11 [150]
	ЦНС	IL-6, IFN- γ [150,151]	CCL2, CCL7 [152]

При бессимптомной инфекции ВЗН отмечается повышение уровня IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-10, IL-17, IL-5 и IL-4, хемокинов CXCL8 и CXCL9, молекулы адгезии E-селектина, молекул, связанных с апоптозом RANK-L и TIM-1, фактора роста GM-CSF и двух растворимых рецепторов IL-2R и ST2/IL-1R4 и снижение уровня молекул, связанных с апоптозом CD40, CD40L, Fas и TRAIL-R3 [153].

1.9.2 NK-лимфоциты

NK-лимфоциты являются частью врождённого иммунитета, специализирующиеся на ранней защите от вирусных инфекций и опухолевых клеток, опосредованной цитокинами, хемокинами и прямой цитотоксичностью. Цитотоксичность NK-клеток зависит от взаимодействия ингибирующих и активирующих рецепторов с рецепторами на клетках-мишенях и опосредуется экзоцитозом цитоплазматических гранул, содержащих перфорин и гранзимы. Также NK-клетки могут активировать апоптоз через TRAIL- и Fas-лиганд. Эти клетки делят на две основные подгруппы: CD56bright - менее зрелые с низкой цитотоксической способностью и преимущественно продуцирующие цитокины, и CD56dim - при взаимодействии с клетками-мишенями обладают мощной цитотоксической активностью и обильной продукцией цитокинов [154].

NK-клетки имеют маркер CD56+ и составляют около 15% лимфоцитов периферической крови. При ВКЭ инфекции NK-клетки могут играть не только защитную роль, но и могут быть связаны с развитием неврологических симптомов заболевания [154]. Было показано, что NK-клетки были обнаружены в спинномозговой жидкости пациентов с КЭ, что указывает на трансмиграцию через ГЭБ [155].

Среди госпитализированных пациентов был описан ответ NK-клеток на инфекцию ВКЭ. Активация NK-клеток была максимальна в начале второй фазы заболевания, в основном они представлены высокодифференцированными CD57+, которые экспрессировали CD38 и имели высокие уровни маркера пролиферации Ki67. Эта вызванная ВКЭ активация NK-клеток была ограничена преимущественно CD57+CD56dim клетками. Одновременно с усилением активации NK-клеток в плазме пациентов были повышены уровни провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ , TNF- α , а также IFN- α . Уровни IFN- γ в день госпитализации коррелировали с уровнями IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 и IFN- α . Активация NK-клеток снизилась до уровня здоровых людей спустя 3 недели после госпитализации [154,156]. Данные активация NK-клеток у людей, инфицированных ВОГЛ и ВПОВ, в литературе не представлены.

При инфекции ВДЕН абсолютное количество NK-клеток у пациентов с легкой формой инфекции было выше по сравнению с пациентами тяжелой формой и

геморрагической лихорадкой денге (ГЛД). Причиной этому может быть миграция к периферическим органам-мишеням. Как при тяжелой инфекции ВКЭ, также при тяжелой инфекции ВДЕН активация НК-клеток происходит в начале острой фазы. В исследовании среди вакцинированных живой аттенуированной вакциной желтой лихорадки штаммом 17D ответ НК-клеток наблюдался у испытуемых уже через 1 неделю после вакцинации [154].

В исследованиях активации НК-клеток при инфекции ВЗН у людей было выявлено, что субпопуляция НК-клеток, экспрессирующих CD56brightCD16- и CD56dimCD16-, продуцирует ИФН- γ в 2 раза больше при симптоматическом течением, чем у лиц с бессимптомной инфекцией [157].

Помимо доказанной активации НК-клеток *in vivo* при различных ортофлавивирусных инфекциях, цитотоксическая роль НК-клеток также подтверждена в экспериментах *in vitro*. Так, было показано, что первично активированные НК-клетки человека ингибируют инфекцию ВЗН в клеточной линии Vero [158].

1.9.3 Гуморальный иммунитет

В ответ на ортофлавивирусную инфекцию образуется широкий спектр специфических и перекрестных антител. Основной мишенью для нейтрализующих антител (НАТ) является белок Е, но также подмножество эпитопов нейтрализации обнаружено на белке ргМ [1,18]. Известно, что нейтрализующие эпитопы расположены во всех доменах белка Е, но наибольшее их число находится в DIII белка Е, при этом видоспецифичные эпитопы больше представлены в DIII, а в DI+II – кроссреактивные [159,160]. Ранее было показано, что при КЭ в сыворотках людей с острой инфекцией больше представлены антитела к DI+II [161].

В результате «вирусного дыхания» для антител становится доступным эпитопы на гидрофобной петле слияния, скрытой в димере белка Е [18]. Также для ортофлавивирусов характерна структурная гетерогенность, в результате которой, образуются незрелые или частично зрелые вирионы, что приводит к распознаванию петли слияния. Поскольку аминокислотная последовательность петли слияния консервативна для ортофлавивирусов, антитела, нацеленные на этот участок являются перекрестными между ортофлавивирусами [18,162].

Антитела к ортофлавивирусам IgM и IgG могут детектироваться как в сыворотке, так и в СМЖ при появлении первых неврологических симптомов. Концентрация IgM начинает увеличиваться с 1-го дня, достигая максимальных значений примерно через 14 дней после появления неврологических симптомов. IgM сохраняются в течение 6–7 недель после заражения. Уровни IgG увеличиваются во время фазы проникновения вируса в ЦНС.

Максимум IgG как в сыворотке, так и в СМЖ достигается примерно через 6 недель после появления первых неврологических симптомов. После инфекции ВКЭ вируснейтрализующие антитела обычно обеспечивают пожизненную защиту [1].

Возможны несколько механизмов, с помощью которых происходит нейтрализация вируса: - прямая нейтрализация связывания вируса с рецептором, - блокирование слияния оболочки вируса с мембранной клетки и - зависимое от Fc-рецептора удаление вируса через ретикулоэндотелиальную систему [163]. Так, на примере ВКЭ было показано, что моноклональное АТ IgG 19/1786 блокировало реорганизацию белка Е из димера в тример, запускаемую низким рН и необходимую для слияния вирусной и эндосомальной мембран [56].

Для вируса денге было показано, что наличие ненейтрализующих антител к NS1 опосредуют лизис инфицированных вирусом клеток, которые экспрессируют этот белок на своей поверхности, за счет комплемент-опосредованного лизиса и/или антителозависимой клеточной цитотоксичности [164].

1.9.4 Т-клеточный ответ

В отличие от NK-клеток CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки распознают последовательности чужеродных пептидов, экспонированных на поверхности клеток и молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I и II, соответственно. Основные функции CD8⁺ Т-клеток заключаются в уничтожении инфицированных клеток посредством высвобождения перфорина и гранзима и в секреции цитокинов, таких как IFN- γ , TNF- α и IL-2. Цитотоксический эффект CD8⁺ Т-клеток на острую инфекцию можно разделить на три фазы [154]. Первая фаза начинается, когда периферические наивные CD8⁺ Т-клетки сталкиваются с антигеном, активируются и начинается пролиферация, а именно наивные клетки дифференцируются в эффекторные цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), они приобретают способность продуцировать противовирусные цитокины (IFN- γ , TNF- α), перфорин и гранзим [165]. После элиминации вируса наступает вторая фаза. Популяция эффекторных Т-клеток сокращается в результате апоптоза. На третьей стадии небольшой пул патоген-специфических Т-клеток (5-10%) дифференцируется в Т-клетки памяти. Они отличаются своей способностью к длительному выживанию, быстрой пролиферацией и приобретению эффекторной функции при повторном воздействии антигена [154].

Стадии дифференцировки CD8⁺ Т-клеток определяются экспрессией специфических поверхностных маркеров, таких как CD45 и CCR7. По ним можно дать характеристику противовирусной реакции. Эти стадии дифференцировки CD8⁺ Т-клеток определяют, как наивные (T_N – naive T cell) - CD45RA⁺CCR7⁺, центральную память (T_{CM} - central memory T

cell) - CD45RA-CCR7+, эффекторную память (T_{ЕМ} - effector memory T cell) - CD45RA-CCR7- и терминально дифференцированными клетками с ограниченной пролиферативной способностью (T_{ЕМРА} - effector memory RA T cell) - CD45RA+CCR7- [154].

Клетки T_{СМ} в основном находятся во вторичных лимфоидных органах, обладают наибольшим пролиферативным потенциалом среди подмножеств Т-клеток памяти и могут быстро пролиферировать и дифференцироваться после повторного заражения. Клетки T_{ЕМ} могут мигрировать между тканями и вторичными лимфоидными органами и обеспечивать иммунный надзор [154].

В исследованиях Т-клеточного ответа человека на инфекцию ВКЭ существуют трудности с определением начала заболевания. В основном исследования иммунного ответа начинаются на стадии госпитализации. Так, было показано, что в течение 1 недели после госпитализации наблюдается значительная активация CD8+ Т-клеток, о чём свидетельствует повышенная экспрессия Ki67. Большая часть CD8+Ki67+ Т-клеток экспрессировала высокие уровни перфорина и гранзима В и низкие уровни антиапоптотического белка Bcl-2. В тоже время CD4+ Т-клетки, в отличие от CD8+, демонстрировали низкие или умеренные уровни активации. Специфичные к антигену ВКЭ CD8+ имели фенотип T_{ЕМ} на протяжении всего заболевания [166].

На примере живой аттенуированной вакцины желтой лихорадки, было показано, что CD8+ Т-клетки активируются в течение 1–2 недель после вакцинации и преимущественно имеют фенотип T_{ЕМ}, который переходит в фенотип памяти T_{ЕМРА} [167].

Причиной неврологического заболевания при ВКЭ, ВПОВ, ВЗН является прямая инфекция нейронов. При летальных случаях у людей, а также в экспериментах на мышах, было показано, что происходит инфильтрация CD8+ Т-клеток в ткани головного мозга, где они могут вызывать повреждения [148,168]. Мышиные модели с дефицитом CD8+ Т-клеток подтверждают это, демонстрируя более длительную выживаемость животных [169]. На нейрональных культурах клеток человека было показано, что в сравнении с клетками, заражёнными ВЗН, в инфицированных ВПОВ наблюдается сниженная воспалительная реакция, что приводит к меньшему апоптозу, но повышенному уровню высвобождаемых хемокинов, которые способствуют привлечению иммунных клеток, в частности лимфоцитов CD8+ [170].

CD4+ Т-клетки человека при КЭ демонстрируют преимущественно тип Th1-лимфоцитов, характеризующихся экспрессией IFN- γ , IL-2 и TNF- α . CD4+ Т-клетки у инфицированных людей определяются как IL-2+TNF- α +IFN- γ +, а среди вакцинированных КЭ большинство CD4+ Т-клеток имеют фенотип IL-2+TNF- α +IFN- γ -. У иммунизированных инактивированной вакциной КЭ лиц Т-клетки с профилем CD4+IFN- γ + составляли

небольшую популяцию, и эти клетки экспрессируют более низкие количества IFN- γ по сравнению с пациентами с КЭ. Популяция CD4⁺ Т-клеток, индуцированные вакциной, демонстрируют различную экспрессию фактора транскрипции Tbet линии Th1, что свидетельствует о том, что вакцинация генерирует популяции клеток Th1 с различными фенотипами дифференцировки, которые включают как эффекторные клетки Th1 (Tbet_{hi}IFN- γ +), так и предшественники Th1 (Tbet_{lo}), которые функционируют как пул клеток памяти, способных дифференцироваться в эффекторные Th1 при последующей антигенной стимуляции [171].

Среди людей, инфицированных ВКЭ, CD4⁺ Т-клетки, как и NK-клетки CD56dim, активированы на стадии госпитализации и экспрессируют значительно более высокие уровни Ki67, CD38, HLA-DR и гранзима В по сравнению с фазой выздоровления. CD4⁺ Т-клетки возвращаются к уровню неинфицированных людей в фазе выздоровления [154]. На примере вакцинации живой аттенуированной вакциной против ВЖЛ, было показано, что пик активаций CD4⁺ Т-клеток приходится на 10 дней после вакцинации и предшествует активации CD8⁺ Т-клеток [154].

1.10 ОРТОФЛАВИВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Для изучения ортофлавирусной нейроинфекции лабораторные мыши представляют собой наиболее практичные и часто используемые животные модели, так как большинство линий лабораторных мышей восприимчивы к этим вирусам, и при инокуляции вирулентными штаммами развивается летальная инфекция, сравнимая с тяжелыми случаями у человека.

При экспериментальном заражении мышей ВКЭ вызывает виремию, размножение вируса в органах и тканях, инфекцию ЦНС и включает такие симптомы как взъерошенную шерсть, потерю веса, парезы и параличи передних и задних конечностей [16]. Симптомы заболевания могут начать развиваться с 6-го дня. В первые дни инфекции в сыворотке мышей детектируются IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-12, TNF- α , IL-2 [6]. Течение инфекции и иммунный ответ может отличаться в зависимости от штамма ВКЭ [6,172,173].

В экспериментах на приматах описаны острые, летальные, бессимптомные и хронические инфекции ВКЭ при подкожном, интрацеребральном, внутривенном, интраназальном введении вируса [26,27,174,175]. При интрацеребральном заражении обезьян вида *S. aethiops* ВКЭ развивались гипертермия, неврологические расстройства, виремия. Инфекционный вирус был детектирован во всём мозге, а также в печени, селезенке, почках и лимфатических узлах обезьян [176]. При подкожном заражении ВКЭ

обезьян вида *C. aethiops* отмечалась лёгкая лихорадка и небольшие морфологические изменения в ЦНС [26].

В экспериментах на мышах инкубационный период при подкожной или внутрибрюшинной инфекции ВПОВ длился 4-6 дней, со средней продолжительностью жизни 8 дней. Симптомы ВПОВ на мышах включают взъерошенную шерсть, потерю веса, сгорбленный позвоночник, парезы и параличи передних и задних конечностей [177]. У лабораторных мышей, инфицированных ВПОВ, наблюдается менингоэнцефалит, обширный некроз мозговых тканей [106]. В данных РНК-секвенирования мышечных тканей отмечается значительное усиление экспрессии генов CX3CR1 и AIRE, что указывает на привлечение CD8⁺ Т-клеток в ткани, инфицированные ВПОВ. Это указывает на то, что патология, наблюдаемая при ВПОВ, обусловлена цитотоксическими CD8⁺ Т-лимфоцитами. ВПОВ является патогенным для макаков-резусов, заболевание у них проявляется в виде агрессивного поведения, тремора, атаксии, парезов, неврологических расстройств [178].

В экспериментах на мышах при внутрибрюшинной инфекции ВОГЛ характерны увеличенная селезенка, признаки висцеротропного заболевания в почках или печени. На более поздних стадиях инфекции у мышей, инфицированных ВОГЛ, наблюдался выраженный некроз белой пульпы селезенки. Было показано, что несмотря на отсутствие неврологического заболевания, гистологическое исследование головного мозга мышей, выявило менингоэнцефалит [106]. При моделировании инфекции ВОГЛ на африканских зелёных обезьянах вида *Cercopithecus aethiops*, было показано, что животные чувствительны к ВОГЛ, в результате инфекции имели гемолитический синдром и тромбоцитопеническую пурпуру на фоне виремии [26]. Двукратная иммунизация обезьян *Cercopithecus aethiops* инактивированной вакциной КЭ привела к высокой индукции НАТ к ВКЭ и ВОГЛ и отсутствию гемолитического синдрома после заражения ВОГЛ, однако, вакцинация не предотвратила попадание вируса в ЦНС [26]. При заражении ВОГЛ и ВКЭ мышей линий BALB/c и C57BL/6 было показано, что доля НК-клеток в селезёнке выше на пятый день после заражения ВОГЛ, а у мышей, заражённых ВКЭ, количество НК-клеток стало увеличиваться только к 9-му. А доля CD4⁺ Т-клеток селезенки существенно не изменялась при заражении ВОГЛ и ВКЭ ни у мышей BALB/c, ни у мышей C57BL/6. Заражение ВОГЛ и ВКЭ значительно увеличивало долю CD8⁺ Т-клеток на ранней стадии инфекции у мышей BALB/c, что значительно более выраженное у мышей, инфицированных ВОГЛ, по сравнению с мышами, инфицированными ВКЭ [147].

Животные, которых использовали для моделирования экспериментальной инфекции ВЗН, включают мышей, крыс, хомяков, обезьян, лошадей, свиней, собак и кошек. Среди

всех моделей наиболее изученной и используемой является мышьяная. Патогенез при ВЗН у мышей схож с человеческим. После подкожной инокуляции ВЗН реплицируется в ДК, которые приносят его в лимфатические узлы. Из лимфатических узлов вирус попадает в кровотоки и периферические органы и примерно через 7 дней после заражения вирус элиминируется из органов и попадает в ЦНС. Признаки поражения у мышей, включают некроз нейронов, периваскулярные мононуклеарные инфильтраты, глиальные узелки, нейронафагия в стволе головного мозга, коре головного мозга, гиппокампе, мозжечке и спинном мозге [113]. При подкожном заражении ВЗН у обыкновенных мартышек вирусемия длилась 4-5 дней, у макак-резус наблюдалась более длительная вирусемия (8-10 дней), наблюдалось небольшое повышение печёночных ферментов АЛТ и АСТ, при этом у обоих видов обезьян отсутствовали клинические и неврологические проявления заболевания. У обоих видов вирус вызывал быструю реакцию NK-клеток CD56dim⁺ и CD16bright⁺, за которой следовали реакции антител IgM и IgG на 9 и 10 день после заражения, соответственно [179]. У макак-резус, перенесших энцефалит, лихорадочную или бессимптомную инфекцию ВЗН при морфологическом исследовании был выявлен подострый воспалительно-дегенеративный процесс в центральной нервной системе [180].

1.11 ПРОФИЛАКТИКА ОРТОФЛАВИВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Для ортофлавивирусов не разработано специфического противовирусного лечения, но против некоторых ортофлавивирусов имеются зарегистрированные вакцины.

В настоящее время зарегистрировано 3 живые аттенуированные вакцины против ВЖЛ, YFV-17DD (Bio-Manguinhos, Бразилия), YFV-17D-204 (Sanofi Pasteur Institute Chiron/Novartis, Франция), и YFV-17D-213 (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия) [181]. Вакцина ВЖЛ создана на основе штамма 17D, который был получен в результате 176 последовательных пассажей дикого штамма Asibi в среде содержащей ткани куриных эмбрионов, у которых была удалена голова и спинной мозг [182].

Против ВЯЭ зарегистрированы живая аттенуированная вакцина SA14-14-2 (Chengdu Institute of Biological Products, Китай) на основе штамма SA₁₄₋₁₄₋₂, инактивированные вакцины JEVIK V (BIKEN, Япония), ENCEVAC (Kaketsuken, Япония), IC51 (Intercell AG, Австрия), на основе штаммов Beijing-1 (P1), Beijing-1 (P3) и SA₁₄₋₁₄₋₂, соответственно. Одной из последних разработанных вакцин против ВЯЭ является рекомбинантная, живая аттенуированная вакцина ChimeriVax-JE (Sanofi-Aventis, Франция), основанная на химерном ВЖЛ штамм 17D, который экспрессирует белки ргМ и Е ВЯЭ штамм SA₁₄₋₁₄₋₂ [183].

Против ВДЕН в коммерческом доступе имеется две вакцины Dengvaxia (Sanofi Pasteur, Франция) и Qdenga (Takeda, Япония). Dengvaxia является тетравалентной рекомбинантной вакциной на основе химерных ВЖЛ штамма 17D, каждый из которых кодирует белки ргМ и Е ВДЕН-1,-2,-3,-4. Долгосрочные исследования безопасности Dengvaxia показали её защитный эффект, однако, среди заболевших вакцинированных детей было больше пациентов с тяжелым течением болезни, чем в контрольной невакцинированной группе. Дополнительные исследования показали, что исходно серонегативные реципиенты всех возрастов имели повышенные показатели тяжелой инфекции денге. Также вакцина не индуцирует иммунитет одинаково для всех 4-х серотипов. Вакцина имитирует первичную инфекцию денге у серонегативных людей, увеличивая вероятность появления ADE при вторичной инфекции. Dengvaxia рекомендована только серопозитивным людям [184].

Вакцина Qdenga разработана на основе ослабленного ВДЕН-2 штамм PDK-53 и химерных ВДЕН-2 штамм PDK-53, кодирующих ргМ и Е ВДЕН-1,-3,-4 [185]. Клинические исследования показали, что вакцинация индуцировала антительный ответ ко всем 4-м серотипам, вне зависимости от предыдущего воздействия. Третья фаза испытания показала, что вакцина эффективна против симптоматической инфекции денге в эндемичных странах [186]. В 2022 году Qdenga получила одобрение в Европейском агентстве лекарственных средств [187].

Для профилактики ВКЭ лицензированы 5 инаktivированных цельновирионных вакцин. Вакцины российского производства разработаны на основе ВКЭ дальневосточного подтипа с использованием первичных фибробластов куриного эмбриона: Клещ-Э-Вак (ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, Россия) – штамм Софьин, Энцевир (ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, Россия) – штамм 205 [1]. Европейские вакцины производятся на основе ВКЭ европейского подтипа, также в клетках куриного эмбриона: FSME-IMMUN (Baxter, Австрия) - штамм Neudörfl, Encepur (NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, GmbH & Co.KG Германия) – штамм Karlsruhe (K23) [1,188]. В Китае используется вакцина «SenTaiBao» (Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd., Jilin, Китай), созданная на основе штамма Sen-Zhang дальневосточного подтипа, культивируемая в клеточной культуре первичной почки хомяка [189].

Несмотря на доказанную эффективность вакцин КЭ, зарегистрированы случаи КЭ у вакцинированных людей [190–193]. Обычно случаи прорыва вакцинации характеризуются лёгким течением инфекции, но бывают и тяжёлые случаи, включая летальные инфекции [191–193]. Предполагаемой причиной таких провалов вакцин может быть ADE. Однако для комариных ортофлавивирусов ADE описывается при инфекции разными подтипами вируса

или близкородственным вирусом, а случаи провала вакцин КЭ описаны на территориях распространения того же подтипа вируса, которым проводилась вакцинация. Также причиной провала вакцин могут быть особенности иммунного статуса пациента на момент вакцинации или инфицирования. Важным фактором в заболеваемости КЭ вакцинированных людей является возможность смешанных вирусных/бактериальных или вирусных/протозойных инфекций, которые могут влиять на иммунный ответ. Дополнительной сложностью при постановке диагноза заболевания КЭ у вакцинированных может быть связана с перекрёстными реакциями в ИФА с другими ортофлавивирусными реакциями. Данный вопрос очень мало изучен.

Для ВЗН, ВЗИК, ВПОВ вакцины находятся на разных стадиях разработок и испытаний [184].

1.12 ПЕРВИЧНЫЙ АНТИГЕННЫЙ ГРЕХ

Для вирусных инфекций характерен эффект предсуществующих АГ или «первичный антигенный грех» (ПАГ). Это понятие впервые было предложено Томасом Фрэнсисом-младшим в 1960 году [194]. В своих исследованиях Ферэнсис заметил, что воздействие антигенно родственных штаммов гриппа в более позднем возрасте приводит к постепенному усилению синтеза первичных антител к вирусу, ответственному за инфекцию, перенесенную в детстве [195]. Понятие ПАГ подразумевает, что в ответ на вторичную инфекцию доминирует пролиферация перекрестно реактивных В-клеток памяти, вызванных первичной инфекцией, которые могут иметь более низкое сродство к вторичному АГ [194,196].

В настоящее время ПАГ активно изучается, но остается еще много нерешенных вопросов. Было показано, что роль первичного воздействия в формировании репертуара антител наблюдалась не только у людей, перенёсших инфекцию вируса гриппа, но и на животных моделях и для других вирусных инфекций, включая лихорадку денге, норовирусную инфекцию, гепатит С, заболевания, вызванные респираторно-синцитиальным вирусом, коронавирусом, энтеровирусами [197]. Во всех случаях проявление ПАГ зависит от родства АГ между возбудителями первичной и вторичной инфекциями, поскольку это явление не наблюдается в контексте последовательного воздействия отдаленно родственных или неродственных АГ [196].

ПАГ может привести к быстрой мобилизации ответа памяти, что во многих случаях может быть выгодным, для быстрого выздоровления или предотвращения заболевания.

Тем не менее, ПАГ может оказывать влияние на формирование иммунного ответа при последующем заражении близкородственным вирусом. Под воздействием предсуществующего иммунитета, индуцированного вакциной против жёлтой лихорадки, может существенно изменяться иммунный ответ на вакцинацию КЭ. А именно было показано, что НАТ, специфичные к ВКЭ, были снижены, в то время как перекрестнореактивные антитела были выше в группе, которая сначала была вакцинирована против ВЖЛ, а затем против ВКЭ, по сравнению с контрольной группой, которой была проведена только вакцинация КЭ [198]. С другой стороны, предварительная вакцинация КЭ не влияет на ранний синтез нейтрализующих АТ, вызванный вакциной против ВЖЛ [199]. Однако, после вакцинации против ВЖЛ у лиц, с предварительной вакцинацией против КЭ, вырабатывается большое количество слабонейтрализующих перекрестнореактивных антител IgG, способных вызывать ADE при инфекции ВДЕН и ВЗИК [199].

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 ЖИВОТНЫЕ

В эксперименте с приматами использовали 12 яванских макак *Macaca fascicularis*. Эксперимент по заражению и взятию крови у животных проводили при участии сотрудников лаборатории биологии арбовирусов Тучинской К.К., Волока В.П., Роговой Ю.В. В том же эксперименте те же животные были использованы для изучения влияния ортофлавивирусной инфекции на когнитивные способности, которые были проведены научным сотрудником лаборатории биологии арбовирусов Роговой Анастасией Андреевной. 12-ти обезьянам было проведено экспериментальное заражение (Таблица 2).

Таблица 2 – Приматы, используемые в эксперименте

Животные	Пол	Возраст, г	Заражение	Эфтаназия, д.п.и.
КЭ-1*	Ж	3		14
КЭ-2	Ж	3	ВКЭ	11
КЭ-3	Ж	4		10
П-1	М	3		11
П-2	Ж	3	ВПОВ	10
П-3	Ж	3		14
КЭ+П-1	Ж	3	ВКЭ	11
КЭ+П-2	М	3	+ВПОВ	14
вП-1	Ж	3	вакцина КЭ	14
вП-2	Ж	3	+ВПОВ	11
К-1	Ж	3		10
К-2	М	4	Физраствор	14

* Сокращения для обезьян: КЭ - инфицированные ВКЭ, П - инфицированные ВПОВ, КЭ+П - смешанная инфекция ВКЭ+ВПОВ, вП - вакцинированные против ВКЭ и инфицированные ВПОВ, К – физраствор.

Вес животных составлял 1,6-3,5 кг. Все животные после привоза прошли карантин в течении 1 месяца. Обезьяны были размещены в одной комнате в индивидуальных клетках, размером 100 см ×70 см×80 см и со специальной конструкцией, позволяющей быстро фиксировать обезьяну. Для животных был организован 12 часовой световой день и

сбалансированное питание. Температуру животных измеряли инфракрасным термометром (Sensitac NF-31-1, Apexmed, Нидерланды) на внутренней стороне бедра, начиная с 10 дня до заражения. После заражения оценку состояния здоровья проводили ежедневно. Кровь на серологические и вирусологические исследования брали из бедренной вены на -5, 2, 4, 7 сутки относительно дня заражения.

На 10-14 день провели эвтаназию путём внутримышечной инъекции наркоза: смесью Золетил (Valdepharm, France) и Ксила (Interchemie Werken De Adelaar Eesti AS, Estonia) из расчета 0,1 мг на кг веса. Затем было проведено взятие крови из сердца, после чего регистрировали смерть животных отсутствием дыхания в течение 10 минут, сердцебиения и рефлекса зрачка на свет. После регистрации смерти было проведено вскрытие с забором органов.

Приматов содержали в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС и российскими санитарными правилами для экспериментальных животных (1045-73). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), протокол №211019-2 от 21 октября 2019 г.

В эксперименте на мышах использовали самок восприимчивых инбредных мышей линии BALB/c (филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» России). На момент вакцинации вес мышей составлял 14-16 г, что соответствует 8-недельному возрасту. Содержание животных осуществлялось в соответствии с международными рекомендациями по обращению с лабораторными животными (Рекомендации CIOMS, 1985, Директива 2010/63/ЕС и Приложение А к Европейской конвенции ETS № 123). Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), протокол № 210121-4 от 21 января 2021 года.

Работа с биологическими образцами, содержащими вирус, а также с образцами, полученными от животных, осуществлялись согласно Санитарным правилам и нормам СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (с изменениями на 25 июня 2025 года).

2.2 КЛЕТКИ И ВИРУСЫ

Клеточную линию почки эмбриона свиньи (СПЭВ) культивировали при 37 °С в среде 199 на сбалансированном солевом растворе Хэнкса и сбалансированном солевом растворе Эрла (2:1, об:об, ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия) с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки (ФБС,

Invitrogen, Waltham, MA, USA). Культивирование клеток СПЭВ проводилось научным сотрудником лаборатории биологии арбовирусов Роговой А.А.

Вирусы, которые использовали при заражении и в реакции нейтрализации представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Вирусы, используемые в работе

Вирус	Штамм	Регион и год получения	Откуда изолирован	Номер в генбанке	Пассажная история *	Использование в экспериментах
ВКЭ, сибирский подтип	ЭК-328	Эстония, 1972 г	I. persulcatus	DQ486861.1	M ₆ C ₁ M ₆ C ₁	Заражение обезьян и мышей, реакция нейтрализации
ВКЭ, дальневосточный подтип	Софьин КГГ	Приморский край, 1937	Мозг умершего пациента	GU121963	MxC ₁ M ₃ C ₁	Заражение мышей, реакция нейтрализации
ВПОВ	Пов-24	Приморский край, РФ, 1975 г	I. persulcatus ticks	MG652438.1	M ₄ V ₁ C ₁	Заражение обезьян и мышей, реакция нейтрализации
ВОГЛ, 1 подтип	Никитина	Омская область, РФ, 1948	Кровь пациента	GU290187	MxM ₃ V ₁ C ₁	Заражение мышей, реакция нейтрализации
ВЗН 2 линия	НР-94	Астрахань	H. marginatum	JX041633.1	MxC ₁₋₂	Заражение мышей, реакция нейтрализации

* М - пассаж в мозге сосунка, Мх – неизвестное количество пассажей через мозг мышей до момента появления в лаборатории. V – пассаж в культуре клеток Vero, С – в культуре клеток СПЭВ

При постановке ПЦР в РВ в качестве внутреннего контроля был использован полиовирус 1 типа штамм Сэбин, любезно предоставленный заведующей лабораторией полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) Козловской Л.И.

2.3 ВАКЦИНАЦИЯ И ЗАРАЖЕНИЕ

Мыши были рандомизированны по весу и разделены на 29 групп. В эксперименте на мышах, иммунизацию проводили цельновирioнной инактивированной вакциной Клещ-Э-

Вак (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия), используя 1/10 от человеческой дозы. Вакцину вводили внутримышечно в бедро по 50 мкл однократно или двукратно с интервалом в 2 недели. Через месяц, три месяца и год после вакцинации подкожно вводили по 100 мкл вируса, предварительно разведенного в среде 199 на Эрле (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия) (Рисунок 7). Дозы вируса приведены в каждом эксперименте отдельно. Невакцинированные мыши, используемые в качестве контроля, были также заражены вирусом параллельно вакцинированным. За 5 и 3 дня до заражения и на 1, 2 и 7 день после заражения у мышей брали кровь из подчелюстной вены на протромбиновое время (ПВ) и нейтрализующие антитела (НАТ) (Рисунок 7). После заражения ежедневно в течение 24-28 дней мышей взвешивали и наблюдали за клиническими проявлениями заболевания. Состояние здоровья мышей оценивали визуально в баллах: 1 – вялость, слабость, взъерошенная шерсть; 2 – учащенное дыхание, выраженная интоксикация, взъерошенная шерсть, сгорбленная спина; 3 – взъерошенная шерсть, потеря веса, паралич передних или задних конечностей; 4 – тетрапаралич, эфтаназия.

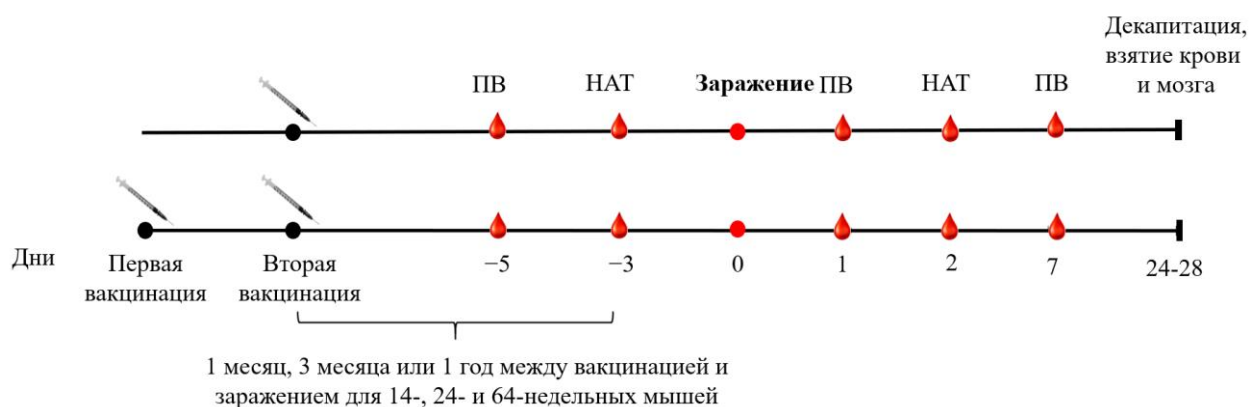


Рисунок 7 – Схема эксперимента на мышах линии BALB/c. Шпатель указывает дни иммунизации вакциной КЭ, ● – взятие крови из подчелюстной вены на исследования

Схема эксперимента на приматах приведена на рисунке 8. После рандомизации методом случайных чисел 2-м животным вводили внутримышечно двукратно с интервалом 11 дней 0,25 мл вакцины КлеЩ-Э-Вак (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия), равной детской дозе. Через 24 дня после последней иммунизации двум вакцинированным обезьянам и 8 невакцинированным подкожно вводили 0,3 мл вирусной суспензии (ВКЭ, ВПОВ, ВКЭ+ВПОВ) в среде 199 на Эрле (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия) в концентрации 7lg(БОЕ/мл). 2 контрольные обезьяны получили 0,3 мл

физраствора (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия) (Рисунок 8 Б).

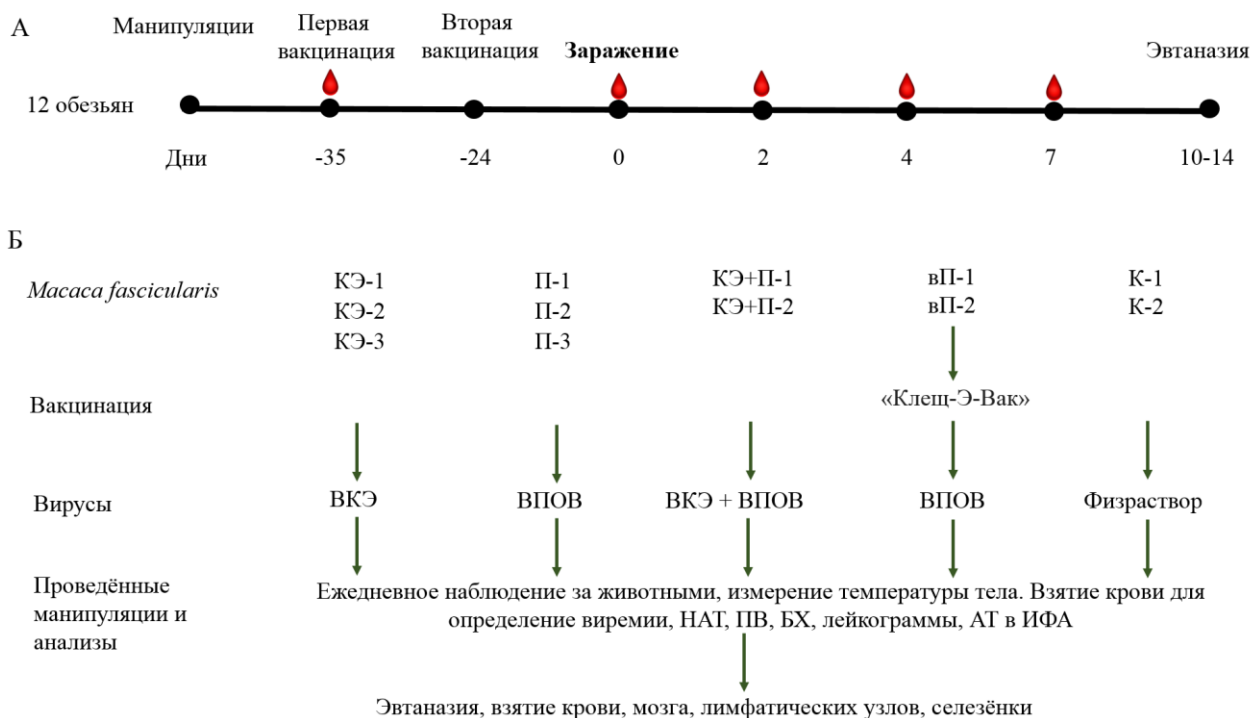


Рисунок 8 – Схема эксперимента на приматах. А – по дням; 🔥 - взятие крови из вены. Б – схема эксперимента с разделением по группам инфицирования соответствующими вирусами [200]

2.4 ТИТРОВАНИЕ ВИРУСОВ И РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ

Титрование вируса и реакцию нейтрализации проводили в 24-луночных пластинах с использованием культуры клеток СПЭВ. Серийные 10-кратные разведения вируса инкубировали с клетками СПЭВ в течение 1 час при 37°C в CO₂-инкубаторе, затем покрывали 1,26% метилцеллюлозой (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США) в среде 199 с солями Хэнкса и Эрла (2:1, V:V), содержащей 2% ФБС и оставляли в CO₂-инкубаторе при 37°C на 6 дней для ВКЭ, ВПОВ, ВОГЛ и на 5 дней для ВЗН. Затем клетки фиксировали 96% этанолом и окрашивали 0,4% красителем генцианвиолет. Титр вируса считали по методу Рида и Менча и выражали через логарифм бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мл (lgБОЕ/мл) [201].

Для определения титра АТ в реакции нейтрализации 50% бляшек делали 4-кратные разведения сывороток в среде 199 на Эрле с 2% ФБС и инкубировали с ВКЭ, ВПОВ, ВОГЛ или ВЗН в соотношении 1:1 в течение 1 час при 37°C, при этом концентрация вируса составляла 30–40 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на лунку. Затем 100 мкл смеси вирус-сыворотка добавляли к клеткам СПЭВ в 24-луночные планшеты, дальнейшие шаги

идентичны процедуре, описанной для анализа бляшек. Каждый эксперимент включал отрицательную и положительную сыворотку с известным титром антител в качестве контроля. Титры НАТ рассчитывали по модифицированному методу Рида и Менча [201].

Эксперименты по титрованию вирусов и определению НАТ частично были проведены совместно со старшим научным сотрудником лаборатории биологии арбовирусов к.б.н. Тучинской К.К.

2.5 ПОЛУЧЕНИЕ ГИПЕРИММУННОЙ АСЦИТНОЙ ЖИДКОСТИ

Аутбредным мышам (ICR) весом 20-22 г подкожно в холку вводили по 0,5 мл смеси вируса с полным адьювантом Фрейнда (1:1) (Difco, США). Введение смеси проводили трижды, с интервалом между введениями в 7 дней. Затем через 7 дней вводили вирус интраперитонеально (и/п) без адьюванта и на следующий день клетки саркомы TG-180, любезно предоставленные сотрудником ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» д.м.н. Бутенко А.М. Через 10-14 дней мышей декапетировали, собирали кровь и накопившуюся асцитную жидкость. Полученную кровь и асцитную жидкость центрифугировали 1500 об/мин на центрифуге Biosan, R6. Супернатант аликвотили и хранили при -20°C до использования.

2.6 ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСА В ОРГАНАХ

Для выявления вируса и вирусной РНК готовили 10% суспензии органов и сгустков крови на физиологическом растворе с помощью лабораторного гомогенизатора TissueLyser II (QIAGEN, Germany) в течение 7 мин с частотой 20 ударов/с.

2.7 ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (ПЦР в РВ)

Вирусную РНК выделяли из 0,125 мл 10% суспензий органов с помощью TRI Reagent LS (Sigma) согласно прилагаемой инструкции. Для обеспечения внутреннего контроля перед выделением РНК во все пробы добавляли по 2 мкл аттенуированного вакцинного штамма полиовируса Сэбин 1 типа. Обратную транскрипцию (ОТ) выполняли с помощью ревертазы M-MLV (Promega, USA), согласно прилагаемому протоколу. Праймерами для ОТ и ПЦР в РВ указаны в таблице 4 для опыта с обезьянами. Данные праймеры также использовали для определения РНК в материале, полученном от животных, заражённых смесью вирусов. Смешанная инфекция в отдельном эксперименте показала возможность дифференцирования системы. Часть работы по выбору праймеров и валидации системы была выполнена ведущим научным сотрудником лаборатории

биологии арбовирусов Литовым А.Г. и младшим научным сотрудником лаборатории биологии арбовирусов Феединой М.П. [202].

Таблица 4 – Праймеры для ОТ и ПЦР в РВ для опыта с обезьянами

Для обратной транскрипции	БКЭ	GTB1R: 5'-CCATTCGGCTCTGAACTTG-3'
	Полио	PVR1: 5'-CGAACGTGATCCTGAGTGTT-3'
	ВПОВ	Pow_681r: 5'-AGACCTTTTCCCCCTAGAT-3'
Для ПЦР в РВ (прямой, обратный, зонд)	БКЭ	TBEL-1: 5'-TCTGAGGGAGACACACTTGG-3', TBER-1: 5'-GTGCGCCTGTAAACAAAGAA-3' TBER-1: 5'-(FAM)-TCCTTGGTGCAGCTGTTTCAGCC-(BHQ1)-3'
	ВПОВ	PowtestR2: 5'-CGTGACGCAAGAGTAGGTGA-3' PowTestF: 5'-CCTTCACATGAGAGGGCGTC-3' PowTestProbe: 5'-(R6G)GCGGGCCAGTGGAAGGGACGC(BHQ2)-3'
	Полио	PVR1: 5'-CGAACGTGATCCTGAGTGTT-3' PVL1: 5'-GGCAGACGAGAAATACCCAT-3' PVP1:5'-(R6G)-TTGATTCATGAATTTCTTCATTGGCA-(BHQ1)-3'

Праймеры для ОТ и ПЦР в РВ для опыта на мышах указаны в таблице 5.

Таблица 5 – Праймеры для ОТ и ПЦР в РВ для опыта на мышах

Для обратной транскрипции	БКЭ	TBE/Pow3': 5'-AGCGGGTGTTTTTCCGAGTC-3'
	ВПОВ	Pow_681r: 5'-AGACCTTTTCCCCCTAGAT-3'
	ВОГЛ	OHFV_Real_R: 5'-TGT-CGA-ACT-CGC-AAG-CTG-AT-3'
	ВЗН	
Для ПЦР в РВ (прямой, обратный, зонд)	Полио	PVR1: 5'-CGAACGTGATCCTGAGTGTT-3'
		F-TBE1 5'-GGGCGGTTCTTGTCTCC-3'
	БКЭ	R-TBE1 5'-ACACATCACCTCCTTGTCAGACT -3' TBE-Probe 5'-(FAM)-TGAGCCACCATCACCCAGACACA-(BHQ1)-3'
	ВПОВ	PowtestR2: 5'-CGTGACGCAAGAGTAGGTGA-3' PowTestF: 5'-CCTTCACATGAGAGGGCGTC-3' PowTestProbe: 5'-(R6G)GCGGGCCAGTGGAAGGGACGC(BHQ2)-3'
	ВОГЛ	OHFV_Real_R: 5'-TGT-CGA-ACT-CGC-AAG-CTG-AT-3' OHFV_Real_F: 5'-ATG-CTG-GTC-TTG-GGA-ACG-AG-3' OHFV_probe: 5'-(FAM) GC-ACC-CAG-ACC-TGG-CCG-ATG (BHQ1)-3'
	ВЗН	WNRT-F: 5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG-3' WNRT-R: 5'-CGGTWYTGAGGGCTTACRTGG-3' Probe_WNV: FAM-WCCCCAGGWGGACTG -BHQ1
	Полио	PVR1: 5'-CGAACGTGATCCTGAGTGTT-3' PVL1: 5'-GGCAGACGAGAAATACCCAT-3' PVP1:5'-(R6G)-TTGATTCATGAATTTCTTCATTGGCA-(BHQ1)-3'

Стандарты для ПЦР в РВ для ВКЭ и ВПОВ готовили как описано ранее [172]. ПЦР в РВ проводили на термоциклере С1000 с детектором Chromo4 (BioRad, Hercules, CA, USA), с использованием набора «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ» (Synthol, Moscow, Russia). Предел обнаружения для ПЦР в РВ был определен серийными разведениями стандартов и составил 100 копий РНК для ВКЭ и для ВПОВ на пробу.

Наличие вирусной РНК для ВЗН и ВОГЛ выявляли по циклу, пробу считали положительной, если она выходила раньше 32 цикла ПЦР. Количество РНК в образцах ВКЭ и ВПОВ выражали как логарифм кДНК на мл 10% суспензии мозга ($\lg(\text{кДНК})/\text{мл}$).

2.8 ПОЛУЧЕНИЕ СТАНДАРТОВ ПОЛИОВИРУСА ДЛЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Для получения внутри лабораторного стандарта аттенуированного вакцинного штамма полиовируса Сэбина типа I проводили трансформацию компетентных клеток *E. coli* штамм Top-10 плазмидой PT7-PW1 по стандартной методике [101]. Выделение плазмиды проводили при помощи коммерческого набора QIAwave Plasmid Miniprep Kit (QIAGEN, Хильден, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Затем для получения линейной ДНК проводили рестрикцию выделенной плазмиды по единственному сайту *EcoR*I. В реакции использовали 178 мкл плазмиды, 20 мкл 10x*EcoR*I буфера и 2 мкл рестриктазы *EcoR*I. Смесь инкубировали при 37°C 3 часа. Из полученной пробы выделяли ДНК методом переосаждения. К 200 мкл линейной ДНК добавили 100 мкл хлороформа и 100 мкл фенола. После тщательного перемешивания смесь инкубировали при комнатной температуре 10 мин, после чего центрифугировали 15 мин при 12000 об/мин. Водную фазу переносили в чистую пробирку, к пробе добавляли 120 мкл 4М ацетата аммония и 360 мкл изопропанола. Смесь инкубировали при комнатной температуре 15 мин и центрифугировали 15 мин при 12000 об/мин. После удаления надосадочной жидкости, к осадку добавляли 500 мкл 80% спирта и снова центрифугировали 5 мин 12000 об/мин. Супернатант удаляли, осадок просушивали от остатков спирта и растворяли в 30 мкл H₂O. Очищенную линейную ДНК использовали для проведения транскрипции. Транскрипцию проводили с использованием T7 РНК полимеразы (TermoFisher, США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные транскрипты разделяли при помощи ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы. Ультрацентрифугирование проводили на приборе Optima Xpn-100 ultracentrifuge с использованием ротора SW-40 (Beckman Coulter Life Sciences, США). Параметры ультрацентрифугирования: 40000 об/мин, 16°C в течение четырёх часов. Градиент сахарозы подготавливали, наслаивая 5% раствор сахарозы в 2xHBS буфере на равный объем 20% раствора сахарозы в 2xHBS буфере. Затем пробиркам с градиентом аккуратно придавали горизонтальное положение и оставляли на три часа.

2xHBS буфер изготавливался по схеме: 1 мл 1 М Tris HCl, pH=7.5; 0.875 г NaCl; 0.25 мл 0,4 М ЭДТА pH = 8 и 1 мл 10% SDS доводили водой до 50 мл до полного растворения (реактивы Sigma, США). Затем градиент фракционировали по 500 мкл. Фракции с наибольшим содержанием РНК очищали от градиента сахарозы переосаждением, как было описано выше. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре SmartSpec Plus (BIORAD, США), которую затем пересчитывали в количество копий РНК/мкл.

2.9 ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТОВ ВКЭ для ПЦР в РВ

Для количественного определения РНК в исследуемых пробах была создана серия стандартных разведений РНК ВКЭ, как описано ранее [203]. Из образца, содержащего ВКЭ штамм ЭК-328, была выделена РНК с помощью TRI Reagent LS (Sigma-Aldrich, США) и поставлена ОТ с праймерами GTB1R для эксперимента с приматами и TBE/Pow3' для эксперимента на мышах (Таблица 4 и 5). ОТ выполняли с помощью ревертазы M-MLV (Евроген, Россия), согласно прилагаемому протоколу. С полученной комплементарной ДНК (кДНК) ставили ПЦР со специфическими праймерами на 3' - концевой участок генома ВКЭ (TBE/Pow3' и BHT7TBEkkgg23) с использованием ДНК - полимеразы DreamTaq (Thermo Scientific, Литва). Затем продукт, полученный после ПЦР, очищали препаративным электрофорезом в 0,9% агарозном геле (TopVision LM GQ Agarose, Thermo Scientific, США), приготовленном в трис-ацетатном буфере (ТАЕ) (0,04 М Трис, 0,04 М уксусной кислоты, 2 мМ ЭДТА). Электрофорез проводили в буфере ТАЕ при напряженности 3,8 В/см. Выделение ДНК из агарозного геля производили с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit 250 (QIAGEN GmbH, Германия) по приложенной к набору методике.

Очищенный продукт использовали для постановки реакции *in vitro*-транскрипции с набором TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученную РНК очищали по методике, описанной в статье [203], после чего концентрацию, полученной РНК измеряли на спектрофотометре SmartSpec Plus (BioRad, США) и готовили серию разведений, с которой ставили ОТ и использовали в качестве стандартов для ПЦР в РВ.

2.10 ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТОВ ВПОВ для ПЦР в РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Для количественного определения РНК ВПОВ в исследуемых пробах была создана серия стандартных разведений РНК, как описано в статье [202]. Для этого была выделена РНК ВПОВ, и поставлена ОТ с праймером Pow_681г (Таблица 4). ОТ выполняли с помощью

ревертазы М-MLV (Евроген, Россия), согласно прилагаемому протоколу. Для амплификации полученной кДНК ВПОВ в ПЦР были использованы праймеры BHT7PowF (5'-ATGACTGGATCCTAATACGACTCACTATAGGAGATTTTCTTGACGTGT-3') и Pow_1116r (5'-AGGCAGTATTCTCTGGTTTC-3'). Продукт, полученный после ПЦР, очищали с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия), затем подвергали *in vitro* транскрипции с использованием РНК-полимеразы Т7 (ThermoFisher Scientific, Литва) согласно прилагаемой методике производителя. Полученную РНК очищали в градиенте сахарозы 5–20%. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре SmartSpecPlus (BioRad, США). РНК из фракции с наибольшей концентрацией выделяли с применением TRI Reagent LS (Sigma-Aldrich, США) и измеряли конечную концентрацию РНК на спектрофотометре и готовили 10-кратные разведения, с которыми ставили ОТ и использовали в качестве стандартов для ПЦР в РВ.

2.11 ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМЕРКЕРОВ ИММУННОГО ОТВЕТА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Уровни интерлейкина-10 (IL-10), фактора некроза опухоли- α (TNF- α), белка сосудистой адгезии-1 (vascular adhesion protein-1 – VAP-1), он же медьсодержащая аминоксидаза 3 (Amine Oxidase Copper Containing 3 – АОСЗ), компонента комплемента С3А и интерферона- α (ИФН- α) в сыворотках животных определяли с помощью наборов ELISA Kit for Interleukin 10 (IL10) (Cloud-Clone Corp., США), ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) (Cloud-Clone Corp., США), ELISA Kit for Amine Oxidase, Copper Containing 3 (VAP-1) (Cloud-Clone Corp., США), ELISA Kit for Complement Component 3a (C3a) (Cloud-Clone Corp., США) для мышей и ELISA Kit for Interferon Alpha (IFN α) (Cloud-Clone Corp., США) для *Rhesus monkey* следуя прилагаемым инструкциям. Ставили двукратные разведения сывороток в 2-х повторностях. Результат регистрировали на спектрофотометре (Multiscan FC Thermo Scientific, США) при длине волны 450 нм. Конечные концентрации IL-10, TNF α , ИФН α , VAP-1 и С3А в исследуемых пробах были рассчитаны относительно калибровочных кривых, построенных по оптической плотности стандартов, согласно инструкции производителя.

2.12 ТИТРОВАНИЕ НА МЫШАХ

Для определения 50% летальной дозы заражения в начале эксперимента было проведено титрование вирусов на мышях BALB/с. Каждой группе по пять мышей вводили подкожно (п/к) 100 мкл 10-кратных разведений вируса в среде 199 на Эрле и в течение 21 дня наблюдали за клиническими проявлениями, симптомами и смертностью. Летальную

дозу (ЛД) вируса, приводящую к 50% смертности, рассчитывали по методу Кербера и выражали в $\log \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$ [204].

2.13 ВИРЕМИЯ

Для определения вируса в крови готовили 10% суспензии сгустков крови, её добавляли по 50 мкл к монослою культуры клеток СПЭВ в двух повторностях и инкубировали 1 час при 37 °С в CO_2 -инкубаторе. После 2 раза отмывали средой 199 на Эрле от эритроцитов, добавили 200 мкл той же среды с 2% ФБС и оставили на 48 часов при 37°С в CO_2 -инкубаторе. Вирус в собранной культуральной жидкости определяли 3-мя способами: титрованием по методу бляшек в культуре клеток СПЭВ, методом ПЦР РВ и в ИФА на антиген ВКЭ Вектор ВКЭ-антиген (Вектор-Бест, Россия) по методике производителя.

2.14 АНАЛИЗ КРОВИ

Лейкограммы подсчитывали в сухих мазках крови обезьян, фиксированных и окрашенных эозин-метиленовым синим по Май-Грюнвальду и азур-эозином по Романовскому («Абрис», Россия), согласно инструкции производителя.

Биохимический анализ сывороток обезьян на аланинаминотрансферазу (alanine aminotransferase - ALT), аспартатаминотрансферазу (aspartate aminotransferase - AST), глюкозе (glucose - GLU), щелочную фосфатазу (alkaline phosphatase - ALP), общий белок (total protein - TP), альбумин (albumin - ALB), мочевины в крови (blood urea - BUN), общий билирубин (bilirubin total - BILT), лактатдегидрогеназу (lactate dehydrogenase - LDH), фосфат (phosphate - PHOS), кальций (calcium - CA), триглицерид (triglycerides - TRIGL), холестерин (cholesterol - CHO), гамма-глутамилтрансферазу (gamma-glutamyl transferase - GGT), амилазу (amylase - AMYL), панкреатическую амилазу (pancreatic amylase - AMY-P) и железо (iron - IRON) проводили на автоматизированном биохимическом анализаторе Cobas C111 (Roche, Швейцария). Биохимический анализ крови проводили совместно с младшим научным сотрудником лаборатории биологии арбовирусов Волоком В.П.

Для определения протромбинового времени (ПВ) кровь собирали в пробирки с 3,8% 3-х замещённым цитратом натрия (Эко-Сервис, Россия) в соотношении 9:1. ПВ считали неавтоматическим методом с использованием набора Диагем-П (Ренам, Россия) согласно инструкции.

2.15 ИФА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ Е ВКЭ

Антигены для ИФА на основе рекомбинантных доменов белка Е ВКЭ были любезно предоставлены лабораторией биохимии ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). В качестве антигенов для разработанного ИФА-анализа были использованы рекомбинантные домены белка Е (sE, dI + II и dIII) ВКЭ штамма Сухар (GenBank # OP185392), относящегося к сибирскому подтипу [205].

Растворы рекомбинантных белков Е (sE, dI + II и dIII) и лизат клеток СПЭВ в качестве отрицательного контроля инкубировали в высокосвязывающих 96-луночных планшетах в количестве 12 нг на лунку при 4 °С в течение ночи. Неспецифические сайты связывания блокировали в течение 1 часа при 37 °С 4% раствором обезжиренного молока в **PBS** ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия) с добавлением 0,05% Tween 20 (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США) (PBST), после чего лунки промывали PBST. Серийные разведения исследуемых сывороток добавляли в лунки на 1 час при 37 °С. Затем в лунки добавляли вторичные антитела, конъюгированное с HRP (Abscam, Уолтем, Массачусетс, США), на 1 час при 37 °С. В каждую лунку добавляли субстратный раствор ТМВ (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте, после чего реакцию останавливали добавлением 2М раствора H_2SO_4 . Результаты определяли путем измерения абсорбции при 450 нм. Сыворотка считалась положительной на наличие антител к ВКЭ, если оптическая плотность (ОП) образца была в два раза выше, чем ОП контрольных лунок. Для построения калибровочной кривой для расчета титра антител в исследуемых сыворотках использовали титрованную положительную сыворотку.

2.16 СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Для анализа выживаемости строили кривые Каплана-Мейера и анализировали их с помощью критерия log-rank с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Индекс нейроинвазивности рассчитывали по формуле $\lg(\text{БОЕ/мл}) - \lg(\text{ЛД}_{50}/\text{мл})$. Титры NAT, РТ, медиану продолжительности жизни, цитокиновый ответ анализировали с помощью теста Манна-Уитни.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ПРОТИВ ВОГЛ и ВПОВ НА РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ НА МЫШАХ ЛИНИИ BALB/c

3.1.1 Характеристика исследуемых ортофлавивирусов

Штаммы вируса, принадлежащие одной генетической линии или одному подтипу, могут значительно различаться по своей патогенности, в том числе нейровирулентности и нейроинвазивности *in vivo* [6,206–209].

Для некоторых штаммов ортофлавивирусов характерна нелинейная гибель при титровании [210,211]. В нашем исследовании такая тенденция прослеживалась для вирусов ВПОВ и ВЗН, которые даже при введении высоких доз вируса, не вызывали гибель 100% животных. Это вносит сложности в использовании методов Рида и Менча и Кребера для определения ЛД₅₀. Тем не менее, для сравнительной оценки исследуемых вирусов условное значение ЛД₅₀ было рассчитано методом Кербера.

Оценку патогенности ВКЭ, ВПОВ, ВОГЛ и ВЗН проводили при подкожном инфицировании на мышах линии BALB/c. Одной из характеристик, отражающих вирулентность вирусов, является индекс нейроинвазивности: чем выше индекс, тем меньше патогенность (Таблица 6). Индекс нейроинвазивности был определен как разница между логарифмами БОЕ вируса, которое было определено в культуре клеток СПЭВ (lg(БОЕ)/мл), и ЛД₅₀, определенного после подкожного заражения мышей линии BALB/c (lg(ЛД₅₀)/мл). Исследуемые вирусы различались по показателю нейроинвазивности. Самый высокий показатель нейроинвазивности наблюдался для ВКЭ (ЭК-328) (1.01), тогда как наименее патогенным при экспериментальной инфекции был ВПОВ (2.78).

Таблица 6 – Индекс нейроинвазивности. Дозы вируса, используемые при заражении.

Вирус	Индекс нейроинвазивности lg(БОЕ/мл)-lg(ЛД ₅₀ /мл)	Дозы при заражении	
		ЛД ₅₀	lgБОЕ
ВКЭ (ЭК-328)	1.01	100	3,41
ВОГЛ	1.64	100	2,98
ВПОВ	2,78	100	4,69
		100	4,4
ВЗН	1.58	10	3,4
		1	2,4

3.1.2 Влияние возраста мышей линии BALB/c на течение ортофлавивирусной инфекции, вызванной ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ

Известно, что возраст пациентов является одним из факторов тяжести течения заболеваний, вызванных ортофлавивирусами [41,42,190,212]. Была проведена оценка влияния возраста мышей линии BALB/c на течение ортофлавивирусной инфекции, вызванной ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ. В исследование были взяты мыши трех возрастных групп: 14-, 24- и 64-недельные, что соответствует молодому, зрелому и среднему возрасту мышей [213]. Мыши были подкожно инфицированы ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ в дозе 100ЛД₅₀ (Таблица 6). В течение 28 дней проводили учет гибели и заболеваемости, которую оценивали по потере веса и клиническим проявлениям заболевания (вялость, взъерошенная шерсть, учащенное дыхание, сторбленная спина, парезы, паралич). Дополнительно проводили исследование наличия вируса в мозге выживших к 28-м суткам животных с помощью ПЦР в РВ.

Выживаемость мышей и медиана средней продолжительности жизни (СПЖ) у 24-недельных мышей, зараженных ВКЭ (ЭК-328), была статистически выше, чем у 14- и 64-недельных мышей (Рисунок 9 А, Таблица 7). При заражении ВОГЛ наблюдалась 100% летальность уже к 13 дню после заражения не зависимо от возраста (Рисунок 9 Б). При заражении ВПОВ, который, как ранее упоминалось, титруется *in vivo* нелинейно, при исследовании на мышах линии BALB/c наблюдались наибольшие различия в показателях летальности, заболеваемости и процента животных, содержащих вирус в мозге, по сравнению с ВКЭ и ВОГЛ. Для 14- и 24-недельных мышей, зараженных ВПОВ, процент летальности и доля мышей, у которых был обнаружен вирус в ЦНС, были примерно на одном уровне (60-70%). При этом заболеваемость для 14-недельных мышей составляла 60%, а для 24-недельных возросла до 90%. Для 64-недельных мышей, соответствующих зрелому возрасту, летальность при заражении ВПОВ упала до 12%, однако доля заболевших мышей, и содержащих вирус в ЦНС, составляла 94% и 82% мышей, соответственно (Рисунок 9 В). Таким образом, более возрастные мыши линии BALB/c значительно реже погибали при заражении ВПОВ, однако, несмотря на это, способность вируса проникать в ЦНС и вызывать заболевание у этих животных без летального исхода увеличилась, что повышает возможность перехода инфекции в хроническую форму.

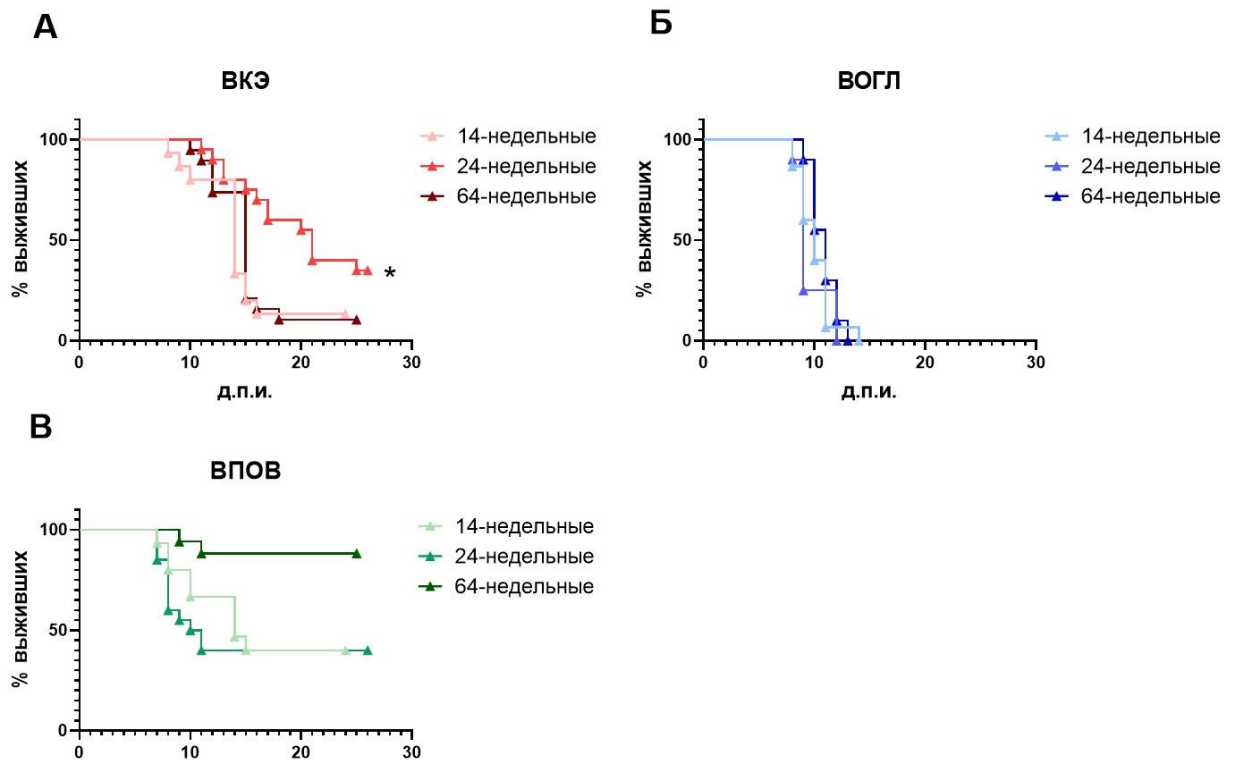


Рисунок 9 – Кривые выживаемости для мышей 14-, 24- и 64-недельного возраста после подкожного заражения ВКЭ (ЭК-328) (А), ВОГЛ (Б) и ВПОВ (В) в дозе 100ЛД₅₀, n=15-20. Статистические различия определяли с помощью Log-Rank теста (*p < 0,1).

Таблица 7 – Характеристика инфекций, вызванных ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ в дозе 100ЛД₅₀^а, в экспериментах на мышах линии BALB/c разного возраста

Вирус	Возраст животных, недели	Медиана ПЖ, дни ^б [min;max]	Летальность, %	Заболеваемость, %	Ко-во мышей с вирусом в ЦНС, % ^с
ВКЭ (ЭК-328)	14	14 [8;16]	87	100	87
	24	17[11;25] ^д	75	95	100
	64	14[9;17]	89,5	100	100
ВОГЛ	14	10[9;13]	100	100	100
	24	9[7;11]	100	100	100
	64	10[8;12]	100	100	100
ВПОВ	14	10 [7;15]	60	60	67
	24	8[7;11]	60	90	70
	64		12	94 ^е	82

^а – 100ЛД₅₀ рассчитано по результатам титрования на молодых 14-недельных мышах.

^б – Медиана продолжительности жизни (ПЖ) посчитана только для погибших мышей.

^с – В данном исследовании считали, что у погибших мышей вирус проник в ЦНС. У выживших мышей вирус в ЦНС детектировали на 24-28 день после инфекции в ПЦР-РВ.

^д – статистически значимое отличие медианы ПЖ 24-недельных от медианы ПЖ для 14- и 64-недельных мышей, зараженных ВКЭ (ЭК-328), рассчитанное по критерию Манна-Уитни (p<0,05).

^е – Статистически значимое отличие % заболеваемости 64-недельных от 14-недельных мышей, заражённых ВПОВ, рассчитанное по точному критерию Фишера (p<0,05).

3.1.3 Изменение титров НАТ с возрастом

Важной характеристикой вирусной инфекции являются титр и спектр индуцируемых антител после заражения. Возрастные изменения могли сказаться на этих показателях, поэтому для более адекватного сравнения использовали такой показатель как титры НАТ у выживших животных на 24-28 сутки, когда гуморальный ответ уже сформирован и титры НАТ были выявлены у всех зараженных животных. Это позволяло нам сравнивать иммунный ответ у животных разного возраста при заражении исследуемыми ортофлавивирусами.

Статистически значимых различий в титрах НАТ в сыворотках мышей разного возраста, зараженных ВКЭ и ВПОВ, не наблюдалось (рисунок 10).

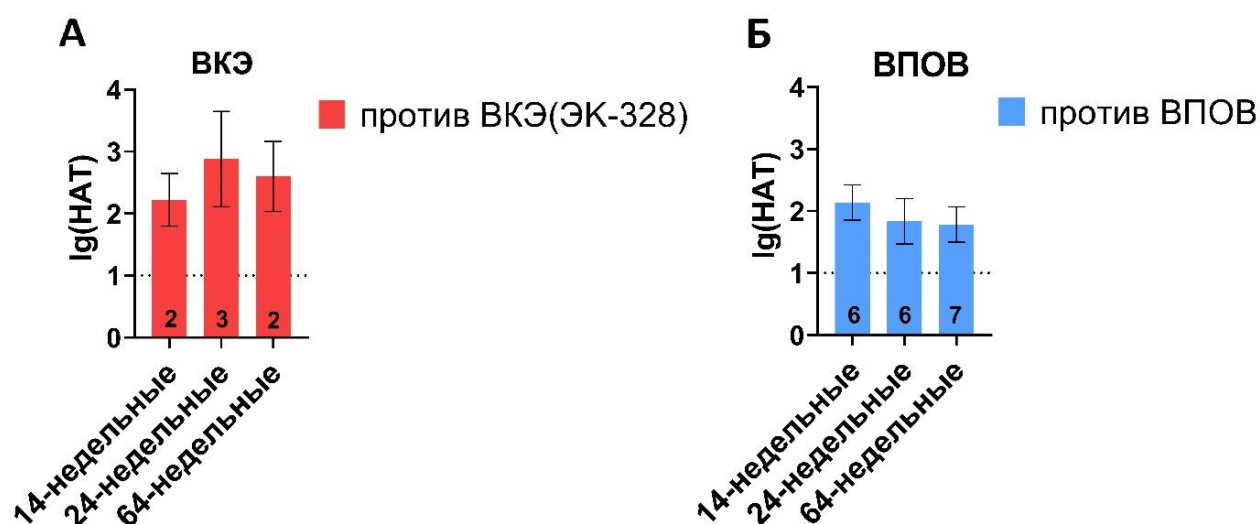


Рисунок 10 – Средние геометрические титры НАТ к ВКЭ (ЭК-328) (А) и ВПОВ (Б) на 28-е сутки после заражения ВКЭ и ВПОВ 14-, 24- и 60- недельных мышей, количество мышей указано в столбцах. Пунктирной линией обозначен предполагаемый минимальный защитный титр НАТ. Разброс представлен средним значением $\pm$ SD.

Для зараженных ВОГЛ мышей невозможно было провести подобное сравнение, т.к. все животные погибали к 13-му дню после заражения.

3.1.4 Изменение поствакцинального иммунного ответа к ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ после иммунизации вакциной КЭ в зависимости от срока после вакцинации

Титры НАТ против вакцинного штамма ВКЭ (шт. Софьин) и исследуемых ортофлавивирусов были проанализированы через месяц после однократной иммунизации вакциной КЭ, а также через месяц, три месяца и через год после двукратного введения вакцины. Двукратную иммунизацию проводили с интервалом в 14 дней.

Через месяц после однократной иммунизации вакциной КЭ процент серопозитивных к вакцинному штамму Софьин и к ВОГЛ мышей ожидаемо был невысоким

(20-40%), что согласуется с ранее полученными нами данными [172]. Среди серопозитивных животных титры НАТ к ВОГЛ были примерно на таком же уровне, что и к вакцинному штамму ВКЭ.

Через месяц после двукратной вакцинации животных с интервалом между инъекциями в 14 дней наблюдалось увеличение количества серопозитивных мышей как к вакцинному штамму (90%), так и к ВОГЛ (100%) в сравнении с однократным введением вакцины. Титры перекрёстных НАТ к ВОГЛ были на том же уровне, что и к вакцинному штамму ВКЭ. Титры перекрёстных НАТ к ВЗН и к ВПОВ через месяц после однократной либо двукратной вакцинации не детектировались ни в одной из исследуемых сывороток (Рисунок 11).

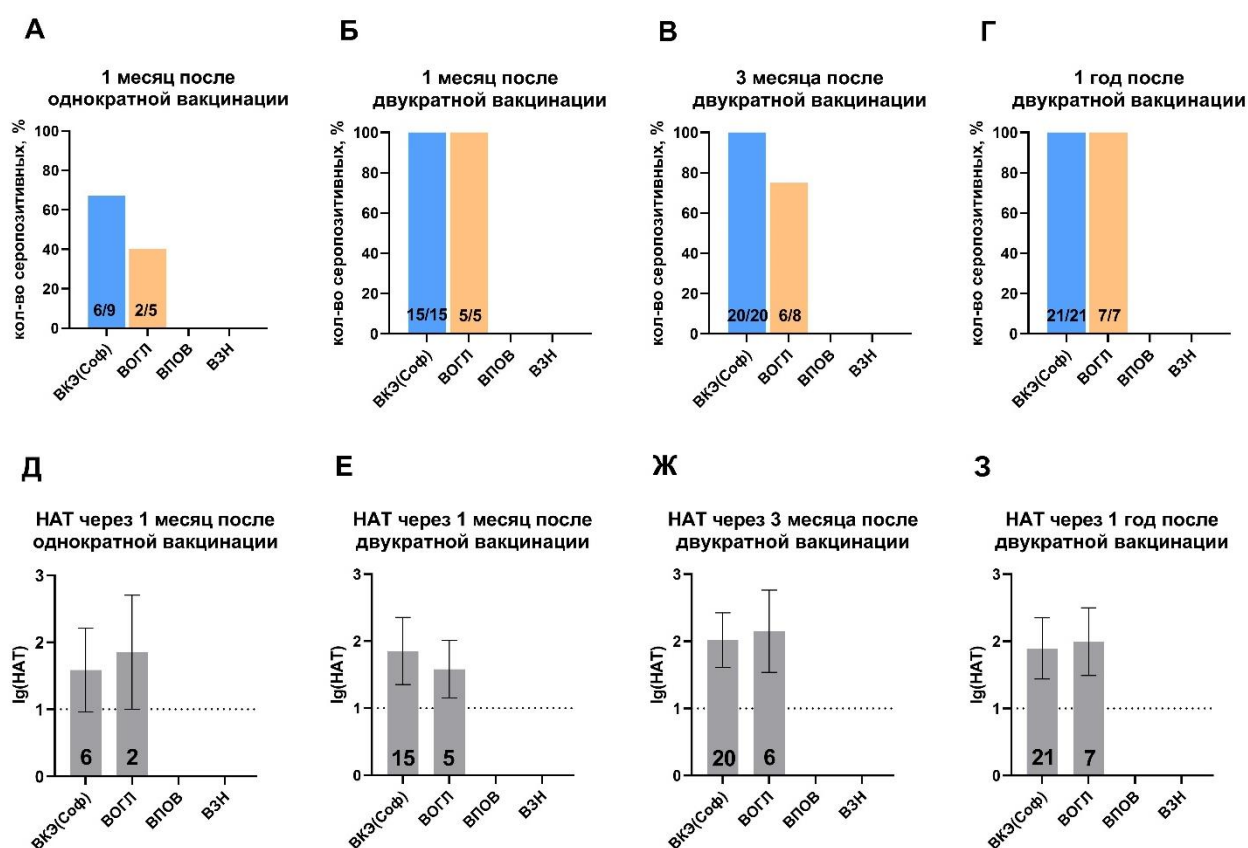


Рисунок 11 – Верхний ряд графиков (А - Г) – количество серопозитивных сывороток от мышей (%) через 1, 3 месяца и 1 год после иммунизации вакциной КЭ. В графиках указано число серопозитивных сывороток из проанализированных. Нижний ряд графиков (Д – З) – средние геометрические титры НАТ в серопозитивных сыворотках (числа указаны в графиках) после иммунизации вакциной КЭ. Пунктирной линией обозначен предполагаемый минимальный защитный титр НАТ. Разброс представлен средними значениями $\pm$ SD

Через 3 месяца и через год в группе двукратно вакцинированных животных процент мышей, серопозитивных к вакцинному штамму ВКЭ и к ВОГЛ, по-прежнему оставался высоким, а титр НАТ был выше условно защитного титра в 1lg во всех положительных

сыворотках. Титр НАТ против ВОГЛ также, как и через месяц после двукратной иммунизации вакциной КЭ, был равен титру НАТ против вакцинного штамма ВКЭ Софьин. Через 3 месяца и через год после двукратной иммунизации вакциной КЭ НАТ к ВПОВ также не детектировались ни в одной из исследуемых сывороток (Рисунок 12).

Это означает, что в реакции нейтрализации, которая является более специфичной чем ИФА, различить НАТ к ВОГЛ и поствакцинальные АТ к ВКЭ может быть затруднительно.

3.1.5 Протективность вакцины КЭ против исследуемых вирусов

Протективность вакцины КЭ оценивали по заболеваемости, летальности мышей и по наличию вируса в мозге мышей на 24-28 сутки после заражения. В дальнейшем группы мышей, заражённые ВКЭ (шт. ЭК-328), ВОГЛ, ВПОВ и ВЗН, будут рассмотрены в каждом отделе, соответствующем времени заражения после последней вакцинации.

3.1.6 Выживаемость мышей, зараженных ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ через 1 месяц после однократной и двукратной иммунизации вакциной КЭ

Несмотря на небольшое число серопозитивных к ВКЭ мышей (67%) через месяц после однократной иммунизации вакциной КЭ (Рисунок 12) летальный исход и признаки заболевания в группе мышей, зараженных ВКЭ (шт. ЭК-328), наблюдались только у 7% животных, в сравнении с контрольной невакцинированной группой, в которой смертность составляла 87%, а заболеваемость 100%, что говорит о высокой эффективности вакцины даже после однократного введения препарата. Доля животных, содержащих вирусную РНК в ЦНС, также подтверждает высокий защитный эффект вакцины от попадания вируса в ЦНС после однократного введения (7% среди вакцинированных животных против 87% в группе невакцинированных мышей). Через 1 месяц после двукратной вакцинации и последующего заражения животных ВКЭ (шт. ЭК-328) наблюдалась 100% выживаемость, отсутствие заболеваемости и вируса в ЦНС (Рисунок 12 А, Таблица 8).

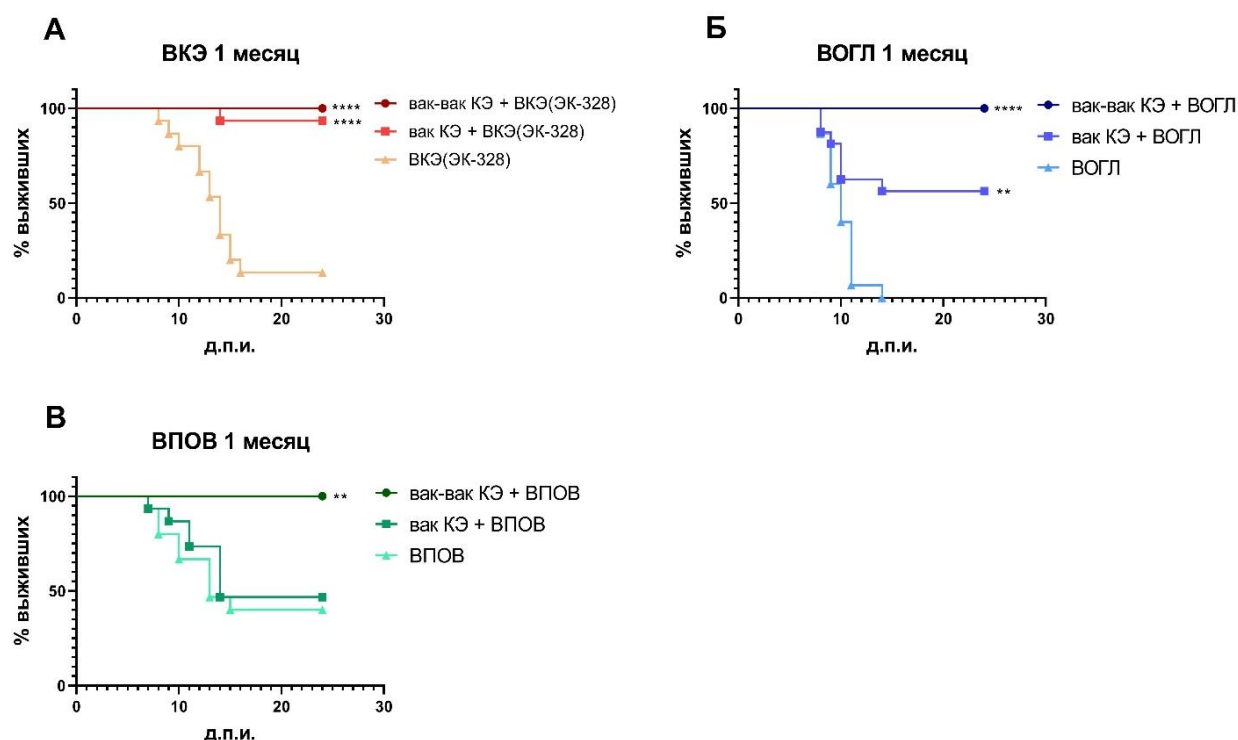


Рисунок 12 – Кривые выживаемости для мышей линии BALB/c, зараженных ВКЭ (ЭК-328) (А), ВОГЛ (Б) и ВПОВ (В) в дозе 100ЛД₅₀ через 1 месяц после однократной или двукратной иммунизации вакциной КЭ, n=15. Статистические различия определяли с помощью Log-Rank теста (** p < 0,01; **** p < 0,0001)

Таблица 8 – Характеристика инфекции, вызванной ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ в дозе 100ЛД₅₀ в эксперименте на мышах BALB/c через 1 месяц после однократной и двукратной иммунизации вакциной КЭ (шт. Софьин)

Вирус	Кол-во мышей	1-я вакцинация	2-я вакцинация	Медиана ПЖ, дни* [min;max]	Количество животных		
					погибших, %	заболевших, %	с вирусом в ЦНС, %**
ВКЭ (ЭК-328)	15	-	-	14 [8;16]	87	100	87
	15	-	+		7	7	7
	15	+	+		0	0	0
	15	-	-	10[9;13]	100	100	100
ВОГЛ	15	-	+	10[8;13]	47	47	47
	15	+	+		0	0	0
	15	-	-	10 [7;15]	60	60	67
ВПОВ	15	-	+	14[8;15]	53	67	53
	15	+	+		0	0	0

* - Медиана ПЖ посчитана только для погибших мышей.

** - В данном исследовании считали, что у погибших мышей вирус проник в ЦНС. У выживших мышей вирус в ЦНС детектировали на 24-28 день после инфекции в ПЦР-РВ

В группе мышей, зараженных ВОГЛ через месяц после однократной иммунизации вакциной КЭ, показатели гибели, заболеваемости, а также доля мышей, у которых вирус

выявлялся в ЦНС, составляли 47%, тогда как в контрольной невакцинированной группе наблюдалась 100% летальность, что говорит о частичном защитном эффекте вакцины даже после однократного введения препарата.

Двукратная иммунизация вакциной КЭ при заражении ВОГЛ через 1 месяц после последней иммунизации защитила от заболевания и гибели 100% животных. При этом ВОГЛ не был обнаружен в ЦНС у выживших животных на 24 сутки после заражения (Рисунок 12 Б, Таблица 8).

Через месяц после однократной иммунизации вакциной КЭ в группе, зараженной ВПОВ, летальность и заболеваемость была примерно на одном уровне с контрольной невакцинированной группой, что говорит об отсутствии защиты вакцины КЭ от ВПОВ после однократного введения препарата. При заражении ВПОВ через 1 месяц после двукратной вакцинации наблюдалась 100% выживаемость, отсутствие заболеваемости и вируса в ЦНС, несмотря на полное отсутствие сероконверсии против ВПОВ после двукратной иммунизации вакциной КЭ (Рисунок 12 В, Таблица 8).

Наблюдаемая эффективность вакцины КЭ в экспериментах на животных против ВОГЛ подтвердилась, как в более ранних исследованиях опубликованных в литературе, но не против ВПОВ, так как ранее для этого вируса было описано отсутствие эффективности вакцины КЭ [39].

3.1.7 Выживаемость мышей, зараженных разными дозами ВЗН через 1 месяц после иммунизации вакциной КЭ

Поскольку для ВЗН показана возможность ADE в экспериментах *in vitro* [214,215], чтобы проследить возможное усиление инфекции, было проведено более детальное исследование влияния иммунизации вакциной КЭ на течение инфекции ВЗН, включающее однократное и двукратное введение препарата вакцины КЭ и заражение тремя разными дозами ВЗН: 1ЛД₅₀, 10ЛД₅₀, 100ЛД₅₀.

Как упоминалось выше, для некоторых ортофлавивирусов характерно отсутствие корреляции между инфицирующей дозой и гибелью животных. В эксперименте по заражению мышей разными дозами ВЗН этот эффект также наблюдался. Мыши без предварительной иммунизации, зараженные ВЗН в дозе 1ЛД₅₀, 10ЛД₅₀ и 100ЛД₅₀, имели одинаково высокие показатели летальности (84-90%) и заболеваемости (95-100%) (Рисунок 13, Таблица 9).

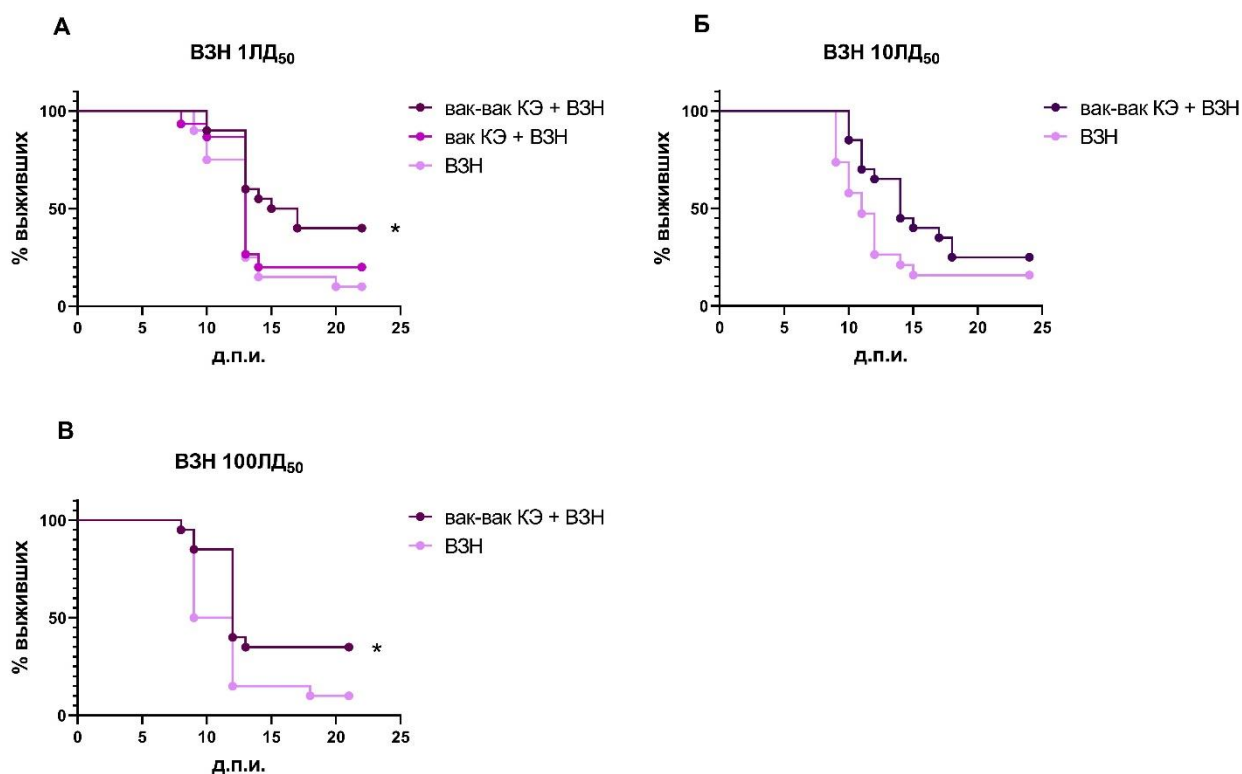


Рисунок 13 – Кривые выживаемости для мышей, заражённых ВЗН в дозах 1ЛД₅₀ (А), 10ЛД₅₀ (Б) и 100ЛД₅₀ (В) через месяц после однократной и двукратной иммунизации вакциной КЭ, n=15-20. Статистические различия определяли с помощью Log-Rank теста (*p < 0,1)

Таблица 9 – Характеристика инфекций, вызванной ВЗН в дозах 1-, 10- и 100ЛД₅₀ (2,4; 3,4; 4,4 лгБОЕ, соответственно) в эксперименте на мышах BALB/c через 1 месяц после иммунизации вакциной КЭ (шт. Софьин)

Вирус	Доза, ЛД ₅₀	Кол-во мышей	1-я вакцинация	2-я вакцинация	Медиана ПЖ, дни *	Летальность, %	Заболеваемость, %
ВЗН	1	20	-	-	12[8;19]	90	95
		15	-	+	12[7;13]	80	93
		20	+	+	12[9;16]	60	80
	10	19	-	-	9,5[8;14]	84	95
		20	+	+	13[9;17]**	75	75
	100	20	-	-	9[8;18]	90	100
		20	+	+	12[8;13]	65	75

* - Медиана СПЖ посчитана для погибших мышей.

** - статистически достоверное отличие от контрольной невакцинированной группы мышей, зараженной ВЗН в дозе 10ЛД₅₀, по критерию Манна-Уитни (p < 0,05).

Через месяц после однократной иммунизации вакциной КЭ в группе, зараженной ВЗН в дозе 1ЛД₅₀, показатели летальности и заболеваемости не отличались от контрольной невакцинированной группы. Через месяц после двукратной иммунизации в группе, зараженной ВЗН в дозе 1ЛД₅₀, смертность составила 60%, что достоверно ниже, чем в контрольной группе, но заболеваемость по-прежнему осталась на высоком уровне (80%) (Рисунок 13 А).

Через месяц после двукратной иммунизации вакциной КЭ в группе, зараженной ВЗН в дозе 10ЛД₅₀, медиана СПЖ достоверно увеличилась, относительно невакцинированной контрольной группы, однако показатели летальности и заболеваемости не снижались относительно контрольной группы невакцинированных животных (Рисунок 13 Б).

Через месяц после двукратной иммунизации вакциной КЭ в группе мышей, зараженных ВЗН в дозе 100ЛД₅₀, летальность была достоверно ниже, чем в невакцинированном контроле, однако заболеваемость оставалась на высоком уровне и составляла 75% (Рисунок 13 В).

Ни в одной из исследуемых групп, предварительно иммунизированных вакциной КЭ, при заражении различными дозами ВЗН не наблюдалось повышения уровня летальности, заболеваемости, либо снижения медианы ПЖ по сравнению с невакцинированными мышами, что говорит об отсутствии АДЕ в данных условиях. Также мы не наблюдали выраженной защиты вакцины КЭ против ВЗН.

Ввиду отсутствия защиты вакцины КЭ против ВЗН, динамику НАТ и эффективность вакцины КЭ против ВЗН на отдаленные сроки после иммунизации в дальнейших экспериментах не исследовали.

3.1.8 Уровень НАТ в сыворотках мышей после заражения ВОГЛ и ВПОВ через месяц после однократной и двукратной иммунизации вакциной КЭ

Важной характеристикой иммунного ответа после вакцинации является бустерный антительный ответ, характеризующийся подъемом титра НАТ в сыворотках иммунизированных мышей после заражения. Мы сравнили титры НАТ до заражения, на вторые сутки и через 24-28 дней после заражения против вакцинного штамма ВКЭ (шт. Софьин) и против вирусов, которые использовали при заражении. В нашем эксперименте бустерный ответ не наблюдался ни в одной из исследуемых групп.

Динамика появления НАТ после однократной вакцинации и последующего заражения была примерно одинаковой для исследуемых вирусов как против вакцинного штамма, так и против вируса, используемого при заражении (Рисунок 14 А, В).

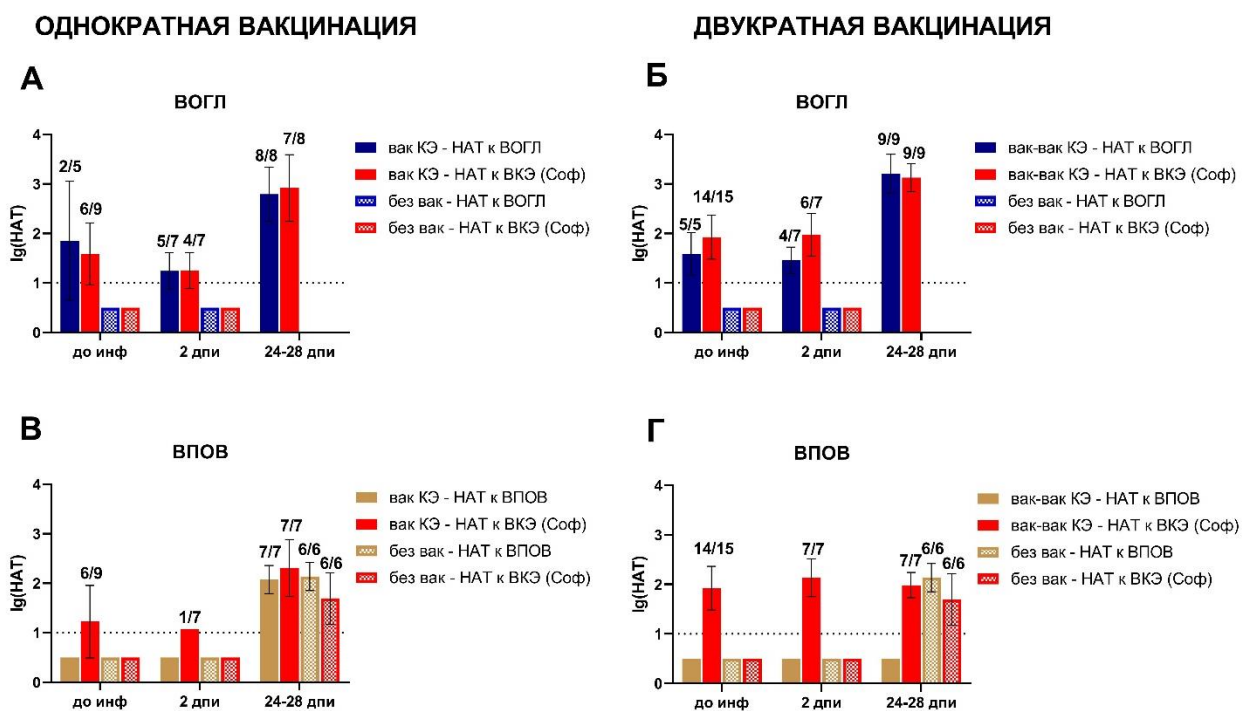


Рисунок 14 – Средние геометрические титры НАТ в серопозитивных сыворотках против ВОГЛ, ВПОВ и вакцинного штамма ВКЭ (шт. Софьин) через месяц после однократной (А, В) и двукратной (Б, Г) иммунизации вакциной КЭ и на 2-е и 24-28-е сутки после заражения соответствующим вирусом. Количество серопозитивных сывороток из всех проанализированных указаны над столбцами. Вакцинированные группы обозначены сплошными столбцами, контрольные невакцинированные – заштрихованными. Точка 24-28 д.п.и. отсутствует для невакцинированных мышей, зараженных ВОГЛ, ввиду высокой летальности к 13-м суткам после заражения. Пунктирной линией обозначен предполагаемый минимальный защитный титр НАТ. В сыворотках с титром НАТ ниже 1 lg условный титр принимали равным 0,5 lg и не использовались в статистическом анализе. Разброс представлен средними значениями $\pm$ SD

В группе, заражённой ВОГЛ после двукратной вакцинации, титр НАТ к вакцинному штамму и ВОГЛ был примерно на одном уровне, за исключением вторых суток после заражения, когда наблюдалось небольшое понижение НАТ к ВОГЛ (Рисунок 15 Б), что можно объяснить связыванием АТ с активно реплицирующимся вирусом.

Как у мышей, вакцинированных однократно, так и у невакцинированных контрольных животных наблюдался рост НАТ к ВПОВ к окончанию эксперимента. При этом необходимо отметить наличие прекрёстно-реагирующих НАТ с ВКЭ (шт. Софьин) в группе контрольных невакцинированных мышей, заражённых ВПОВ (Рисунок 15 В, Г). В группе, заражённой ВПОВ после двукратной иммунизации вакциной КЭ, НАТ к вакцинному штамму были выявлены в высоких титрах во всех исследуемых временных точках после заражения. При этом только для этой группы наблюдалось увеличение НАТ против вакцинного штамма Софьин на 2-е сутки после заражения вирусом. НАТ против ВПОВ были выявлены только у невакцинированных мышей, а у мышей с предварительной

двукратной вакцинацией не обнаруживались даже на 28-е сутки после введения вируса (Рисунок 14 Г).

3.1.9 Выживаемость мышей, зараженных ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ через 3 месяца после двукратной иммунизации вакциной КЭ

Через 3 месяца после двукратной иммунизации вакциной КЭ в группе, зараженной ВКЭ (шт. ЭК-328), вакцина показала высокую эффективность как против летальности, так и против заболеваемости в сравнении с контрольной невакцинированной группой. При этом вирус в ЦНС у выживших вакцинированных животных выявлялся только у 10%, тогда как в контрольной группе этот показатель составлял 100% (Рисунок 15 А, Таблица 10).

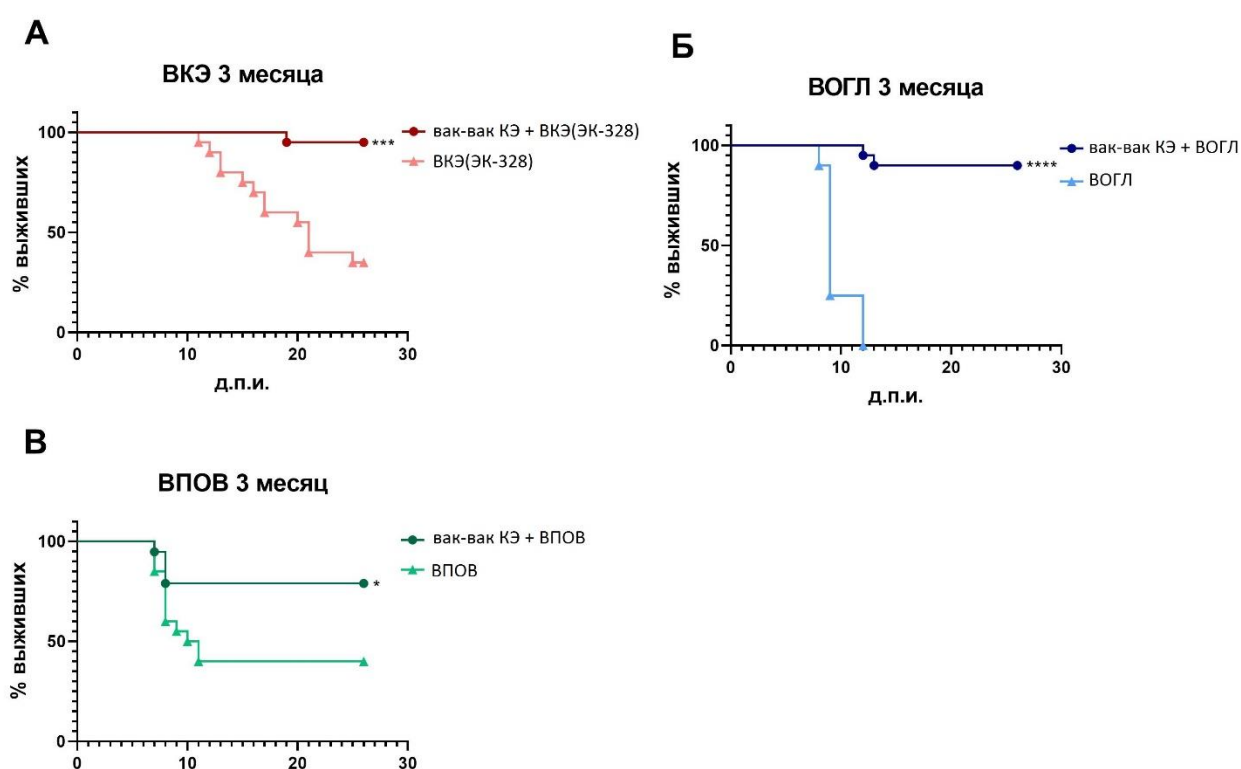


Рисунок 15 – Кривые выживаемости для мышей линии BALB/c, зараженных ВКЭ (ЭК-328) (А), ВОГЛ (Б) и ВПОВ (С) в дозе 100ЛД₅₀ через три месяца после двукратной иммунизации вакциной КЭ, n=20. Статистические различия определяли с помощью Log-Rank теста (*p<0,1** p<0,01; **** p<0,0001)

Таблица 10 – Характеристика инфекций, вызванных ВКЭ(ЭК-328), ВОГЛ, ВПОВ в дозах 100ЛД₅₀^а в эксперименте на мышах BALB/с через три месяца после двукратной иммунизации вакциной КЭ (шт. Софьин)

Вирус	Кол-во мышей	Вакцинация	Медиана ПЖ, дни ^б	Количество мышей		
				погибших, %	заболевших, %	с вирусом в ЦНС, % ^с
ВКЭ (ЭК-328)	20	-	17[11;25]	75	95	100
	20	+	[17]	5	10	10
ВОГЛ	20	-	9[7;11]	100	100	100
	20	+	[11;13]	10	10	10
ВПОВ	20	-	8[7;11]	60	90	70
	19	+	8[7;8]	21	21	21

^а - 100ЛД₅₀ рассчитано по результатам титрования на молодых 14-недельных мышах.

^б - Медиана ПЖ посчитана для погибших мышей.

^с - В данном исследовании считали, что у погибших мышей вирус проник в ЦНС. У выживших мышей вирус в ЦНС детектировали на 24-28 день после инфекции в ПЦР-РВ.

Через три месяца после двукратной иммунизации вакциной КЭ в группе, зараженной ВОГЛ, смертность составляла 10%, в сравнении с контрольной невакцинированной группой, в которой наблюдалась 100% летальность (Рисунок 15 Б, Таблица 10). Таким образом, даже через три месяца после последней иммунизации вакцина показала высокую протективность против ВОГЛ.

Через три месяца после двукратной иммунизации вакциной КЭ в группе, зараженной ВПОВ, показатели летальности и заболеваемости у вакцинированных были значительно меньше, чем в контрольной невакцинированной группе (21% против 60% и 21% против 90%, соответственно). Это говорит о частичной защите вакцины от ВПОВ через три месяца после последней иммунизации, несмотря на отсутствие противовирусных АТ к ВПОВ до заражения (Рисунок 15 В, Таблица 10).

3.1.10 Уровень НАТ в сыворотках мышей после заражения ВОГЛ и ВПОВ через три месяца после двукратной иммунизации вакциной КЭ

При заражении через три месяца после двукратной вакцинации бустерного эффекта не было отмечено ни к одному из исследуемых вирусов, как и через месяц после заражения.

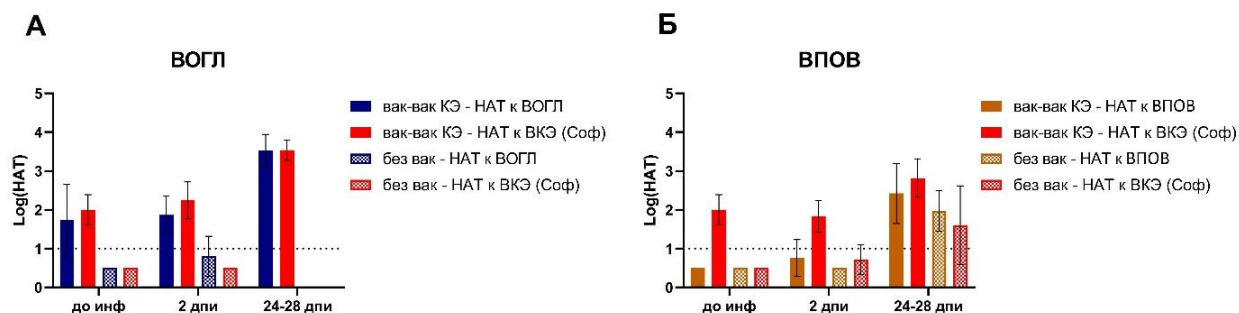


Рисунок 16 – Динамика средних геометрических титров НАТ к ВОГЛ (А), ВПОВ (Б) и вакциному штамму ВКЭ через 3 месяца после двукратной иммунизации вакциной КЭ. Количество серопозитивных сывороток из всех проанализированных указаны над столбцами. Вакцинированные группы обозначены сплошными столбцами, контрольные невакцинированные – заштрихованными. Невакцинированные мыши, зараженные ВОГЛ, не имеют точки на 24-28 д.п.и. ввиду высокой летальности до окончания эксперимента. Пунктирной линией обозначен предполагаемый минимальный защитный титр НАТ. В сыворотках с титром НАТ ниже 1 lg условный титр принимали равным 0,5 lg и не использовались в статистическом анализе. Разброс представлен $\pm$ SD

В группе двукратно вакцинированных мышей, зараженных ВОГЛ, титры НАТ к вакцинному штамму и ВОГЛ имеют схожую динамику (Рисунок 16 А). При этом титры НАТ к ВОГЛ были равны или незначительно ниже, чем к вакцинному штамму Софьин.

В группе вакцинированных мышей, заражённых ВПОВ, НАТ в сыворотках до и на 2-й день после инфицирования детектировались в основном к вакцинному штамму ВКЭ Софьин, и только в двух сыворотках детектировались к ВПОВ (Рисунок 16 Б). К 24-28 суткам после заражения титры НАТ к вакцинному штамму ВКЭ и ВПОВ у вакцинированных мышей были незначительно выше, чем у невакцинированных (статистически недостоверно). При сравнении титров НАТ к ВКЭ и ВПОВ на 24-28-е сутки после заражения ВПОВ в группе предварительно вакцинированных животных прослеживается тенденция к более низким значениям титров НАТ к ВПОВ по сравнению с титрами НАТ к ВКЭ.

3.1.11 Выживаемость мышей, зараженных ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ через один год после иммунизации вакциной КЭ

Через год после двукратной иммунизации вакциной КЭ в группе мышей, зараженных ВКЭ (шт. ЭК-328), вакцина показала высокую эффективность как в отношении летальности, так и заболеваемости в сравнении с невакцинированным контролем. При этом вирус в ЦНС у выживших вакцинированных животных выявлялся у 21%, тогда как в контрольной группе этот показатель составлял 100% (рис 17 А, Таблица 11).

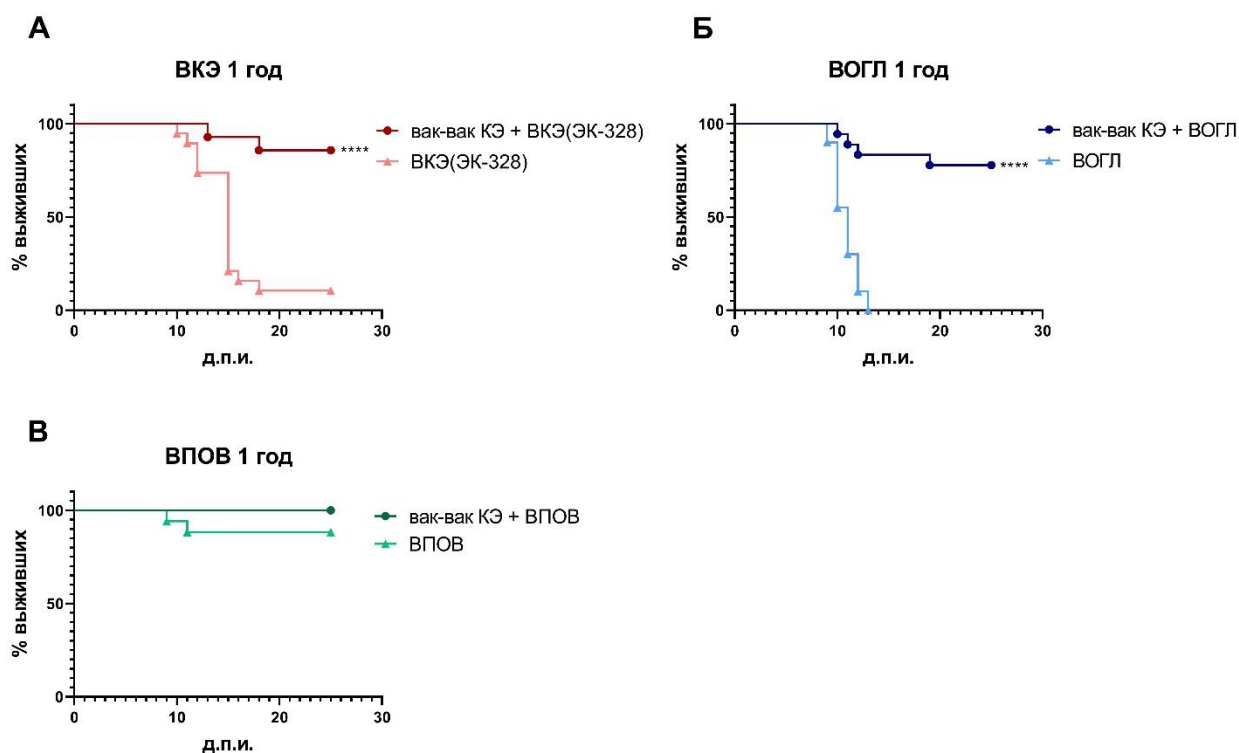


Рисунок 17 – Кривые выживаемости для мышей линии BALB/c, зараженных ВКЭ (ЭК-328) (А), ВОГЛ (Б) и ВПОВ (В) в дозе 100ЛД₅₀ через год после двукратной иммунизации вакциной КЭ, n=14-20. Статистические различия определяли с помощью Log-Rank теста (**** p < 0,0001)

Таблица 11 – Характеристика инфекции, вызванной ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ в дозе 100ЛД₅₀^а в эксперименте на мышах BALB/c через год после иммунизации вакциной КЭ (шт. Софьин)

Вирус	Кол-во мышей	Вакцинация	Медиана ПЖ, дни ^б	Количество мышей		
				погибших, %	заболевших, %	с вирусом в ЦНС, % ^с
ВКЭ (ЭК-328)	19	-	14[9;17]	89,5	100	100
	14	+	[17]	14	35	21
ВОГЛ	20	-	10[8;12]	100	100	100
	18	+	10,5[9;18]	22	22	22
ВПОВ	17	-	[12;14]	12	94	82
	18	+		0	29	29

^а - 100ЛД₅₀ рассчитано по результатам титрования на молодых 14-недельных мышах.

^б - Медиана ПЖ посчитана для погибших мышей.

^с - В данном исследовании считали, что у погибших мышей вирус проник в ЦНС. У выживших мышей вирус в ЦНС детектировали на 24-28 день после инфекции в ПЦР-РВ.

Через год после двукратной иммунизации вакциной КЭ летальность и заболеваемость в группе, зараженной ВОГЛ, наблюдались у 22% животных, в сравнении с контрольной невакцинированной группой, в которой эти показатели составляли 100%.

Таким образом, даже через год после последней иммунизации вакцина показала высокую эффективность при инфекции, вызванной ВОГЛ (Рисунок 17 Б, Таблица 11).

У вакцинированных мышей, зараженных ВПОВ через год после иммунизации, выживаемость составляла 100%, а заболеваемость составляла всего 29%. В контрольной невакцинированной группе мышей, соответствующих по возрасту вакцинированным мышам летальность составляла 12%, а заболеваемость 94% (Рисунок 17 В, Таблица 11). Вирус в ЦНС у вакцинированных детектировался только у 29%, против 82% у невакцинированных животных. Это означает, что, несмотря на снижение летальности мышей BALB/c с возрастом при заражении ВПОВ, вакцина КЭ защитила их как от заболевания, так и от проникновения вируса в ЦНС.

3.1.12 Уровень НАТ в сыворотках мышей после заражения ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ через один год после двукратной иммунизации вакциной КЭ

Через год после вакцинации на 2-е сутки после заражения бустерный иммунный ответ у вакцинированных мышей не наблюдался, также как через месяц и три месяца после последней иммунизации вакциной КЭ, что можно объяснить связыванием антител с новым активно реплицирующимся вирусом. Напротив, на 2-е сутки после заражения отмечается тенденция к снижению НАТ против вакцинного штамма ВКЭ Софьин.

Через год после вакцинации была проанализирована динамика титров НАТ к ВКЭ (ЭК-328) и вакцинному штамму (Софьин). У дважды вакцинированных мышей, инфицированных ВКЭ (ЭК-328), средние геометрические титры НАТ к вакцинному штамму были выше, чем к ВКЭ (ЭК-328) во все временные точки. У невакцинированных мышей наблюдалась тенденция к более высоким титрам НАТ на 24-28-е сутки после вакцинации как к вакцинному штамму, так и к ВКЭ (ЭК-328), в сравнении с вакцинированными животными (рисунок 18 А).

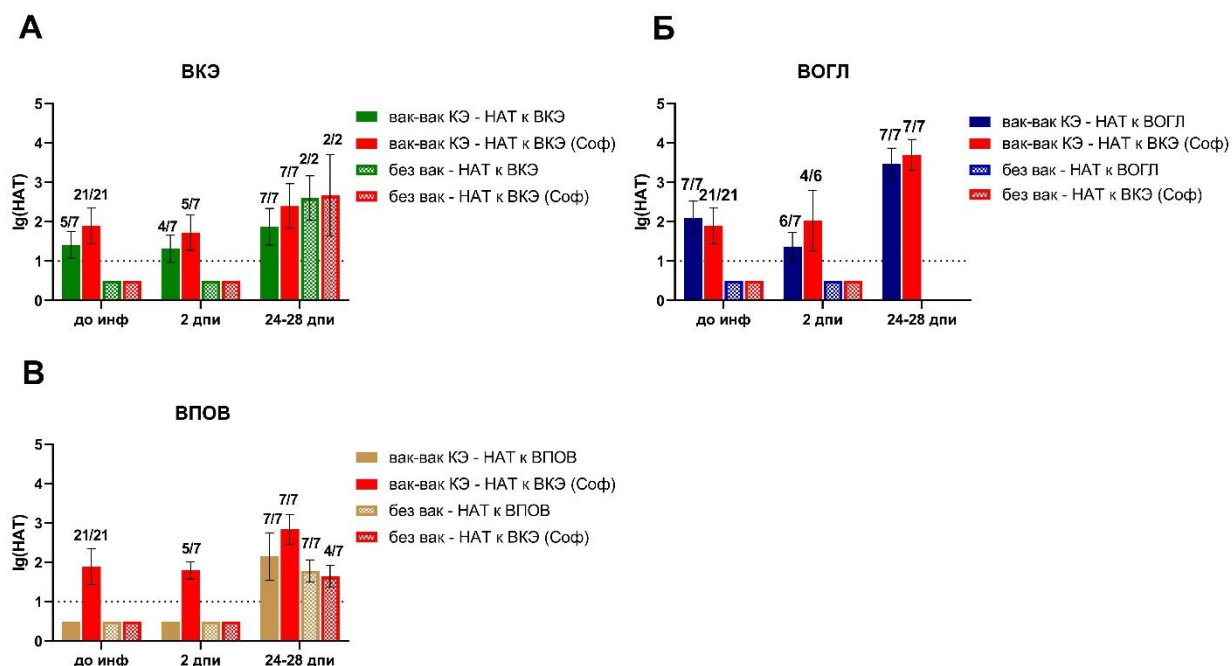


Рисунок 18 – Средние геометрические титры НАТ в серопозитивных сыворотках к БКЭ (ЭК-328) (А), ВОГЛ (Б), ВПОВ (В) и вакцинному штамму через год после двукратной иммунизации вакциной КЭ и на 2-е и 24-28-е сутки после заражения соответствующим вирусом. Количество серопозитивных сывороток из всех проанализированных указаны над столбцами. Вакцинированные группы обозначены сплошными столбцами, контрольные невакцинированные – заштрихованными. Точка 24-28 д.п.и. отсутствует для невакцинированных мышей, зараженных ВОГЛ, ввиду высокой летальности к 13-м суткам после заражения. Пунктирной линией обозначен предполагаемый минимальный защитный титр НАТ. В сыворотках с титром НАТ ниже 1 lg условный титр принимали равным 0,5 lg и не использовались в статистическом анализе. Разброс представлен средними значениями $\pm$ SD

В группе, заражённой ВОГЛ, у предварительно вакцинированных мышей среднее значение титров НАТ к ВОГЛ и вакцинному штамму по-прежнему сохраняли сходную динамику, как и у мышей, зараженных через 3 месяца после вакцинации (Рисунок 18 Б).

НАТ к ВПОВ не детектировались ни до заражения, ни на 2 сутки после заражения, однако увеличивались к 28-м суткам и были незначительно выше как к ВПОВ, так и к БКЭ штамму Софьин в группе предварительно иммунизированных вакциной КЭ мышей в сравнении с невакцинированным контролем (Рисунок 18 В).

В группах, зараженных БКЭ (шт. ЭК-328) через год после иммунизации вакциной КЭ, ВОГЛ и ВПОВ, на всех временных точках мы наблюдали повышение НАТ к вакцинному штамму. Это может говорить о том, что в первую очередь образуются НАТ на первичный АГ, чем характеризуется эффект предсуществующих АТ.

3.1.13 Титры НАТ через месяц после заражения ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ в сыворотках мышей с предварительной иммунизацией вакциной КЭ

В группе мышей, двукратно иммунизированных вакциной КЭ и затем заражённых ВКЭ (шт. ЭК-328), антитела к штамму ЭК-328 по сравнению с НАТ к вакцинному штамму Софьин на 28-е сутки после инфицирования значительно различались в группе молодых (14-недельных) мышей, инфицированных через месяц после вакцинации и были значительно выше к вакцинному штамму Софьин ВКЭ. Титры НАТ к ВКЭ (ЭК-328) были значительно выше в группе зрелых 24-недельных мышей, заражённых через три месяца после иммунизации вакциной, по сравнению с титрами НАТ в сыворотках 14- и 64-недельных животных, заражённых через месяц и год после последней вакцинации, соответственно (Рисунок 19 А). Титры НАТ к вакцинному штамму Софьин ВКЭ были ниже у мышей, инфицированных через год после вакцинации, по сравнению с молодыми 14-недельными мышами, заражённых через месяц после последней иммунизации вакциной КЭ.

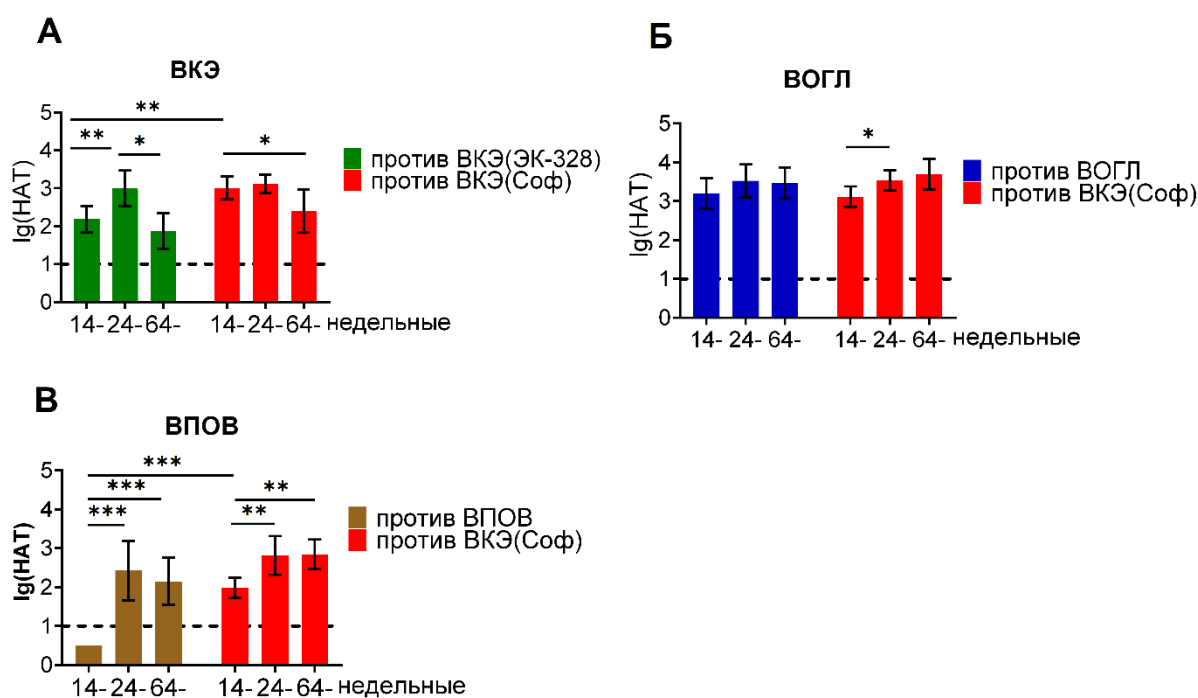


Рисунок 19 – Средние геометрические титры НАТ на 28-е сутки после заражения ВКЭ (ЭК-328), ВОГЛ, ВПОВ через месяц (14-недельные мыши), три месяца (24-недельные мыши) и год после иммунизации (64-недельные мыши), против ВКЭ (ЭК-328) (А), ВОГЛ (Б), ВПОВ (В), соответственно, и к вакцинному штамму Софьин (красный). Разброс представлен средними значениями $\pm$ SD, статистическая значимость определена по критерию Манна-Уитни (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

В группе вакцинированных животных, инфицированных ВОГЛ, на 28-й день после заражения титры НАТ к вакцинному штамму ВКЭ в сыворотках молодых мышей были

ниже, чем в сыворотках зрелых 24-недельных мышей, инфицированных через три месяца после вакцинации.

В группе вакцинированных мышей, инфицированных ВПОВ, титры НАТ к ВПОВ и вакцинному штамму на 28-й день после инфицирования были статистически выше у зрелых мышей, инфицированных через три месяца после вакцинации, и у мышей среднего возраста, инфицированных через год после вакцинации, чем у молодых мышей, инфицированных через месяц после вакцинации (рисунок 12 с). Это может указывать на то, что у вакцинированных животных спектр НАТ, индуцированных инфицированием гетерологичным вирусом, изменяется в зависимости от увеличения срока после вакцинации или возраста лабораторных животных.

3.1.14 Протромбиновое время

Поскольку для ВОГЛ характерен геморрагический синдром, дополнительно была проведена оценка системы коагуляции крови с помощью измерения протромбинового времени (ПВ), которое является показателем внешнего пути свертывания крови.

Оценка ПВ у мышей всех возрастов с предварительной иммунизацией вакциной КЭ и без нее, позволила выявить, как такие факторы, как возраст и вакцинация, влияют на систему свертывания крови у мышей BALB/c (Рисунок 20). Иммунизация вакциной КЭ не оказывала значительного влияния на ПВ. Однако было обнаружено, что ПВ различался между возрастными группами. Наиболее высокий показатель ПВ наблюдался в группе зрелых 24-недельных мышей (как вакцинированных, так и невакцинированных).

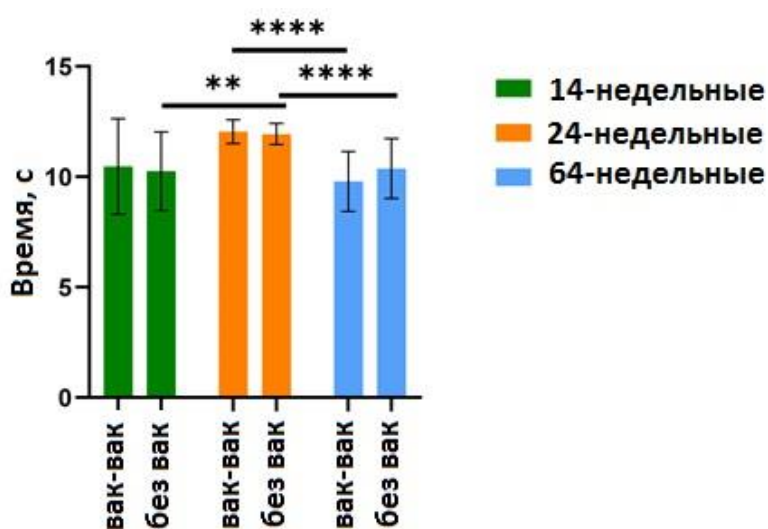


Рисунок 20 – ПВ у вакцинированных и невакцинированных мышей BALB/c различного возраста: молодые 14-недельные, зрелые 24-недельные и 64-недельные мыши среднего возраста. Разброс представлен медивной $\pm$ 95% CI. Статистическая значимость определена по критерию Манна-Уитни (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$)

После заражения ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ вне зависимости от статуса вакцинации статистически значимые изменения показателя ПВ наблюдались только в группах зрелых 24-недельных мышей на первые или седьмые сутки после заражения по сравнению со значениями ПВ до инфицирования (рисунок 21 Б, Д, З) и в группе 64-недельных мышей, заражённых ВОГЛ (рисунок 21 Е). В группах 24-недельных мышей наблюдалось снижение ПВ на следующий день после заражения ВКЭ и ВПОВ. Однако у мышей, зараженных ВОГЛ, снижение ПВ сохранялось и через семь дней после заражения. Тенденция к снижению ПВ также наблюдалась в группе молодых 14-недельных мышей, инфицированных ВПОВ, через семь дней после заражения (Рисунок 21 Ж). Однако из-за ограниченного размера выборки наблюдаемая разница не была статистически значимой.

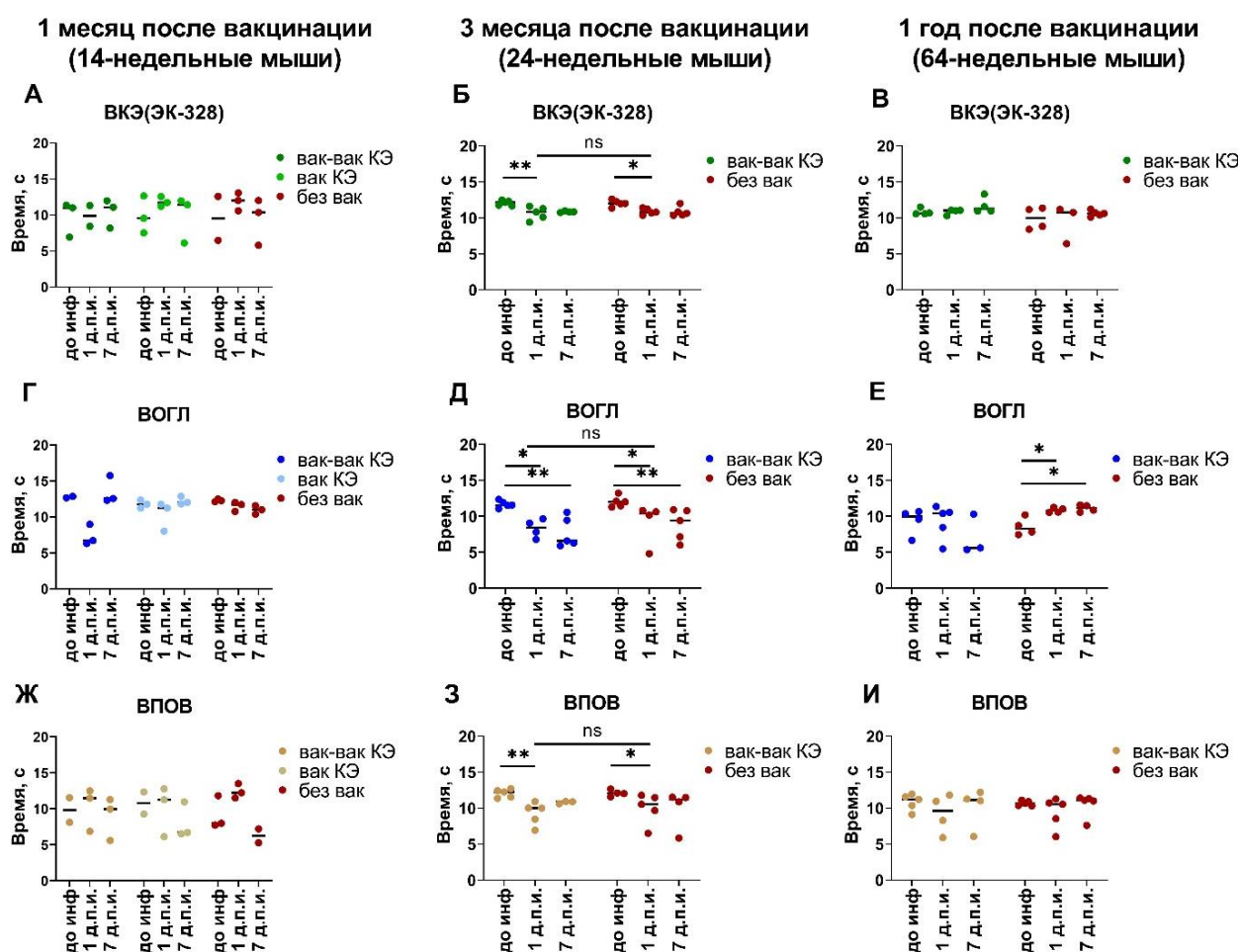


Рисунок 21 – ПВ для мышей, зараженных ВКЭ (ЭК-328) (А, Б, В), ВОГЛ (Г, Д, Е), ВПОВ (Ж, З, И) через один месяц (А, Г, Ж – молодые 14-недельные мыши), три месяца (Б, Д, З – зрелые 24-недельные мыши) и через один год (В, Е, И – старые мыши, 64-недельного возраста) после вакцинации КЭ и без неё. Кровь брали у одних и тех же мышей. “—” – медиана. Статистическую значимость определяли по критерию Манна-Уитни (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Различия в динамике ПВ между вакцинированными и невакцинированными мышами наблюдались в группе 64-недельных мышей, инфицированных ВОГЛ (Рисунок 21

Е). В этой группе у невакцинированных мышей ПВ увеличивалось на первый и седьмой день после заражения, в то время как у вакцинированных мышей, выживших к концу эксперимента, ПВ имело тенденцию к снижению на седьмой день после заражения. Кроме того, в группе молодых 14-недельных вакцинированных животных, вживших после заражения ВОГЛ, также было отмечена тенденция к снижению ПВ (Рисунок 21 Г). Напротив, у молодых мышей, погибших после заражения ВОГЛ, которые не были иммунизированы или получили одну иммунизацию, ПВ оставалось неизменным.

У молодых мышей, зараженных дозами 1ЛД₅₀ и 100ЛД₅₀ ВЗН, как у иммунизированных вакциной КЭ, так и неиммунизированных, мы не наблюдали значимых изменений в ПВ. Тенденцию к понижению ПВ наблюдали только на 7-е сутки в группе невакцинированных мышей, зараженных ВЗН в дозе 100ЛД₅₀ (Рисунок 22 В).

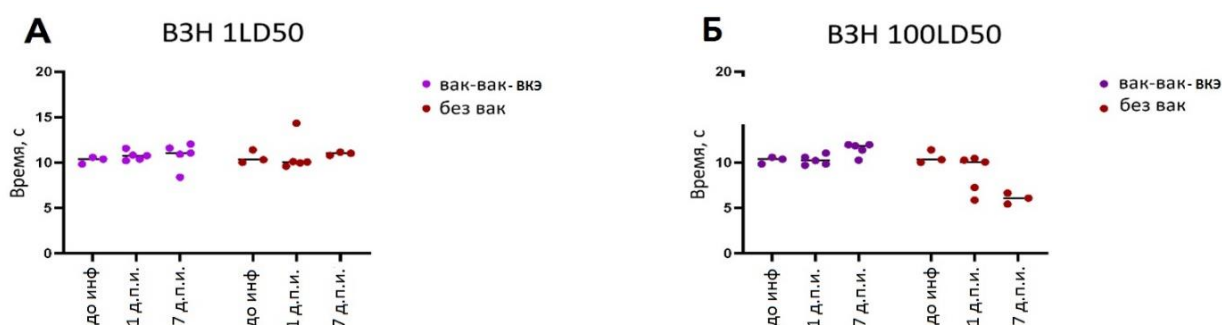


Рисунок 22 – ПВ для мышей, зараженных ВЗН через месяц после иммунизации вакциной КЭ

Наблюдаемые понижения ПВ на 1- или 7-е сутки после заражения могут свидетельствовать о том, что в виду воспалительного процесса в кровотоке был увеличен уровень тканевого фактора (ТФ), что при анализе плазмы способствовало укороченному времени образования фибринового сгустка.

Определение ПВ показало, что инфекция, вызванная исследуемыми ортофлавивирусами, влияет на систему коагуляции крови на ранних стадиях инфекции. Характер изменений зависит от возраста животных. Предварительная вакцинация может влиять на динамику ПВ на ранних стадиях инфекции, однако степень этого влияния зависит от вируса и возраста животных.

3.1.15 Биомаркеры иммунного ответа в процессе инфекций, вызванных ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ, ВЗН

Провоспалительные цитокины являются одним из факторов, влияющих на проницаемость сосудов и активацию эндотелия и могут выступать в роли маркеров начальных стадий ортофлавивирусной инфекции. На небольшой выборке животных был

проведён пилотный эксперимент по измерению уровня цитокинов в сыворотках предварительно вакцинированных и невакцинированных мышей линии BALB/c, зараженных исследуемыми ортофлавивирусами: провоспалительного (TNF- α) и противовоспалительного (IL-10), которые играют значительную роль в патогенезе ортофлавивирусной инфекции [216]. Кроме того, в сыворотках лабораторных мышей измеряли уровень растворимого белка VAP-1 (vascular adhesion protein-1), который экспрессируется в основном эндотелиальными клетками, гладкими мышечными клетками, адипоцитами и перицитами, участвует в адгезии лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов на поверхности эндотелия с последующей миграцией клеток из кровеносных сосудов [217,218]. Экспрессию VAP-1 могут повышать такие провоспалительные цитокины как IL-1, TNF- α , IFN- γ [219]. Повышение уровня растворимого белка VAP-1 в сыворотке крови может служить маркером воспаления, так как во время воспаления мембранный белок VAP-1 перемещается из внутриклеточных гранул на поверхность эндотелиальных клеток и в результате протеолитического расщепления его внеклеточного домена попадает в кровь [220].

Для измерения цитокинов и VAP-1 кровь брали у невакцинированных и двукратно вакцинированных 14-недельных мышей на 2-е, 7-е сутки после заражения ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ и ВЗН (Рисунок 23).

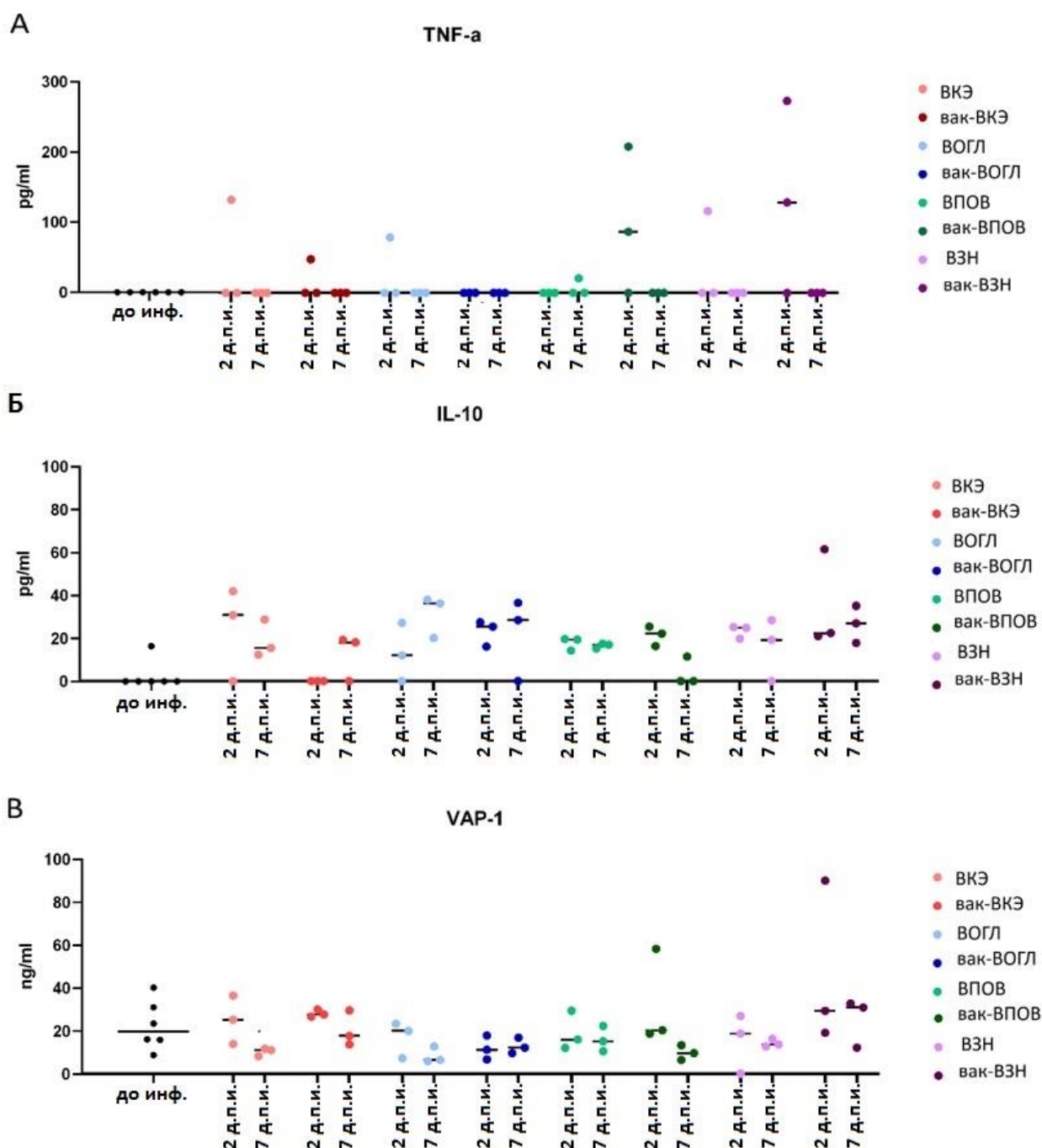


Рисунок 23 – Уровни TNF-a, IL-10 и VAP-1 в сыворотке крови мышей, инфицированных ВКЭ(ЭК-328), ВОГЛ, ВПОВ и ВЗН через месяц после двукратной иммунизации вакциной КЭ.

Динамика появления и исчезновения цитокинов в крови может носить индивидуальный характер. Отсутствие какого-либо маркера может быть обусловлено его физиологическим отсутствием или неоптимальным временем забора материала. Группы включали по три животных. Несмотря на малый размер групп, данный эксперимент позволил выявить некоторые отличия, которые свидетельствовали об особенностях воспалительной реакции при инфицировании разными вирусами.

В контрольных сыворотках крови, взятых до заражения, TNF-a не детектировался (0/6). После заражения исследуемым вирусами повышение уровня TNF-a у

иммунизированных и неиммунизированных мышей выявляли на вторые сутки хотя бы у одной из трёх мышей и не выявляли на 7-е сутки, за исключением одной мыши, иммунизированной против КЭ и зараженной ВПОВ (Рисунок 23 А). У мышей, вакцинированных против КЭ и заражённых ВОГЛ, TNF-а не детектировался на 2- и 7-е сутки. Это может быть связано с тем, что для этого вируса появление TNF-а в крови приходится на другой срок.

До заражения в контрольных сыворотках IL-10 детектировался у одной из шести мышей (1/6). После заражения всеми исследуемыми вирусами повышение уровня IL-10 детектировали как на вторые сутки после заражения, так и на седьмые сутки в сыворотках крови мышей с и без предварительной иммунизации (Рисунок 23 В). IL-10 появляется в ответ на TNF-а и снижает продукцию провоспалительных цитокинов. С этим согласуется отсутствие TNF-а на 7-е сутки.

До заражения исследуемыми вирусами VAP-1 детектировался у всех животных (6/6). Заражение ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ и ВЗН не выявило явного влияния на содержание VAP-1 в сыворотке крови, вероятно, ввиду небольшой выборки животных или неподходящего времени сбора сывороток. Однако, по разному содержанию VAP-1 в индивидуальных сыворотках наблюдалась тенденция к снижению концентрации этого белка практически во всех группах к 7-му дню по сравнению со 2-м днём после заражения (Рисунок 24 С).

При ортофлавивирусной инфекции в экспериментах на мышах мы видим активацию синтеза как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, уже на 2-е сутки после заражения, а также изменение уровня белка сосудистой адгезии (VAP-1). Предварительная двукратная иммунизация против КЭ, по-видимому, может оказывать влияние на уровень или динамику этого процесса, но это влияние может иметь различия между ортофлавивирусами.

Ранее в экспериментах *in vitro* было показано, что высокие дозы компонента комплемента С3А, приводят к активации эндотелия и разрушению эндотелиального барьера [221,222]. В своей работе уровни С3А мы измеряли на 2- и 7-е сутки у невакцинированных и только на 2-е сутки у вакцинированных мышей, зараженных ВКЭ, ВОГЛ, ВПОВ и ВЗН (Рисунок 24). У неиммунизированных животных на 2-е сутки после заражения уровень С3А не отличался от контрольных сывороток, полученных до заражения. У мышей с предварительной вакцинацией наблюдали более низкие показатели, чем у невакцинированных. На 7-е сутки прослеживалась тенденция к снижению уровня С3А у неиммунизированных мышей, заражённых ВКЭ и ВПОВ. Это может быть связано с появлением в крови белка NS1, который способен ингибировать систему комплемента. У

мышей, заражённых ВОГЛ, такое снижение наблюдалось уже на 2-е сутки. Вакцинация предотвращала это снижение.

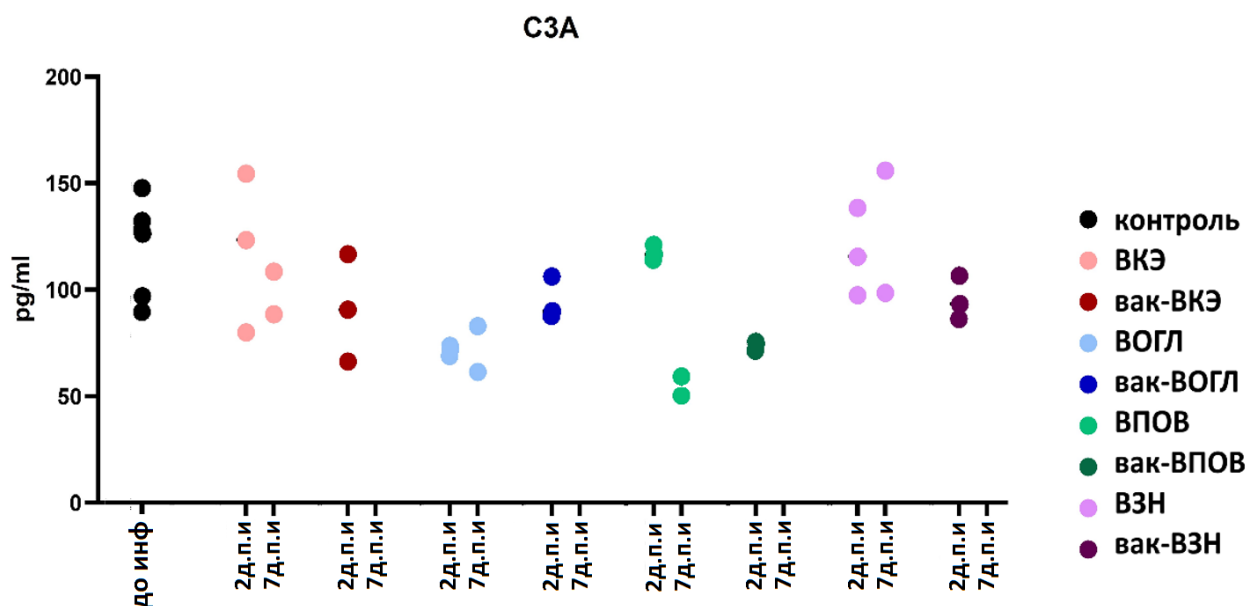


Рисунок 24 – Концентрация СЗА в сыворотке крови мышей, инфицированных через месяц после двукратной иммунизации вакциной КЭ и у неиммунизированных животных. У вакцинированных мышей данные на 7 д.п.и. отсутствуют. * - указаны дни, когда наблюдали статистически значимое отличие от контрольных значений, полученных до заражения, по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$)

3.2 СМЕШАННАЯ ИНФЕКЦИЯ ВКЭ и ВПОВ НА МЫШАХ

На Дальнем Востоке существуют сопряженные очаги ВКЭ и ВПОВ. Кроме того, имеются данные, свидетельствующие о возможности смешанной инфекции сразу двумя вирусами [15]. Поэтому нами был проведен эксперимент по заражению мышей линии BALB/c смесью ВКЭ и ВПОВ. В эксперимент были взяты 64-недельные мыши, соответствующие старому возрасту. Доза для каждого из вирусов была рассчитана на молодых 14-недельных мышках и составляла 100ЛД₅₀.

В группе контрольных мышей, зараженных только ВКЭ, летальность составляла 90%, заболеваемость – 100%, а вирус в ЦНС на 24-28 сутки был обнаружен у всех зараженных животных. В группе, зараженной только ВПОВ, летальность составила 12%, ввиду низкой чувствительности к ВПОВ у мышей среднего возраста, однако заболеваемость и вирус в ЦНС наблюдались у 94% и 82% мышей, соответственно. Летальность мышей, заражённых смесью вирусов, оказалась средней между данными показателями для моноинфекций (Рисунок 25). Заболеваемость в этой группе составила 86%, а летальность – 40%. Для выявления вирусов в мозге мышей использовали систему ПЦР в РВ, которая позволяет дифференцировать РНК ВКЭ и ВПОВ в смеси [202]. По

результатам ПЦР в РВ в ЦНС выживших мышей на 24-28 день после инфекции детектировался только ВПОВ (Таблица 12).

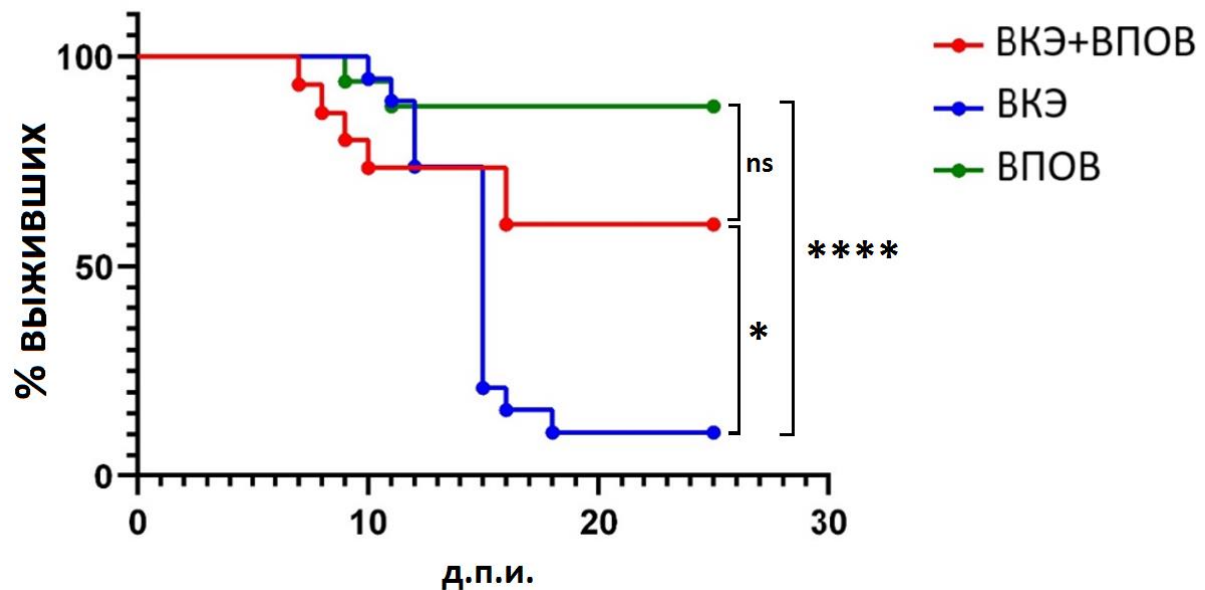


Рисунок 25 – Кривые выживаемости для мышей линии BALB/c, заражённых ВКЭ (синяя линия), ВПОВ (зелёная линия) и ВКЭ+ВПОВ (красная линия), N=15-20. Статистические различия определяли с помощью Log-Rank теста (**** $p < 0,0001$, * $p < 0,1$)

Таблица 12 – Характеристика инфекций, вызванных ВКЭ, ВПОВ и смесью ВКЭ+ВПОВ в дозах 100ЛД₅₀ при подкожном заражении 64-недельных мышей линии BALB/c, N=15-20

Вирус	Медиана ПЖ [мин-макс] (дни)	Летальность, %	Заболеваемость , %	Количество мышей с РНК вируса в ЦНС (%)	
				ВКЭ	ВПОВ
ВКЭ (Эк-328) + ВПОВ	9,5[7;16]	40	86	0 у выживших	100% у выживших
ВКЭ (Эк-328)	14[9;17]	90	100	100	-
ВПОВ		12	94	-	82

3.3 МОДЕЛИРОВАНИЕ БЕССИМПТОМНОЙ ОРТОФЛАВИВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ОБЕЗЬЯНАХ ВИДА *MACACA FASCICULARIS*

В эксперименте по моделированию бессимптомной ортофлавивирусной инфекции использовали 12 обезьян вида *Macaca fascicularis*, 9 самок и 3 самца, в возрасте 3-4 года (глава 2, раздел 2.1, Таблица 2). Обезьяны были разделены на 5 групп: 1 – контрольные, которым был введён физраствора (К-1, К-2), 2 – заражённые ВКЭ (КЭ-1, КЭ-2, КЭ-3), 3 – заражённые ВПОВ (П-1, П-2, П-3), 4 - заражённые смесью вирусов ВКЭ+ВПОВ (КЭ+П-1,

КЭ+П-2), 5 – обезьяны, иммунизированные вакциной КЭ и заражённые ВПОВ (вП-1, вП-2). Схема эксперимента представлена в главе 2, разделе 2,3, рисунок 9.

3.3.1 Предсуществующие антитела к ортофлавивирусам у интактных животных

Сыворотки крови обезьян были проанализированы на наличие НАТ к ВЗН, ВКЭ и ВПОВ в реакции нейтрализации перед началом эксперимента, чтобы проверить, все ли обезьяны были иммунологически наивны к ортофлавивирусам. Поскольку обезьяны были получены из питомника, расположенного в г. Сочи, они могли контактировать с комарами – переносчиками ортофлавивирусов, в частности ВЗН, который эндемичен для юга России. У двух обезьян были выявлены НАТ: у обезьяны К-1 (контрольная группа) - 1,84 lg к ВЗН, у обезьяны КЭ-2 (группа ВКЭ) - 1,81 lg к ВЗН и 1,86 lg к ВКЭ (Таблица 13). В связи с ограниченным набором вирусов, использованных для анализа в реакции нейтрализации, и возможной перекрестной реактивности антител к ортофлавивирусам, нельзя однозначно утверждать о вирусной специфичности выявленных НАТ к ВКЭ, ВЗН или другому ортофлавивирусу.

Таблица 13 – Титры НАТ в сыворотках обезьян вида *Macaca fascicularis* до инфицирования и вакцинации. «-» титр НАТ <0,9lg

группы	физраствор		ВКЭ			ВПОВ			ВКЭ+ВПОВ		вак+ВПОВ	
№ обезьяны	К-1	К-2	КЭ-1	КЭ-2	КЭ-3	П-1	П-2	П-3	КЭ+П-1	КЭ+П-2	вП-1	вП-2
IgНАТ к ВКЭ	-	-	-	1,86	-	-	-	-	-	-	-	-
IgНАТ к ВПОВ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IgНАТ к ВЗН	1,84	-	-	1,81	-	-	-	-	-	-	-	-

3.3.2 Исследование биохимических показателей крови обезьян вида *Macaca fascicularis* после заражения ВКЭ, ВПОВ и смешанной инфекции ВКЭ и ВПОВ

После заражения обезьян ВКЭ, ВПОВ и ВКЭ+ВПОВ визуальные клинические показатели заболевания отсутствовали, общее состояние животных и температура тела были в пределах нормы.

Для человека характерно повышение уровня печеночных ферментов на начальной стадии острой инфекции КЭ, при этом АСТ и АЛТ в сыворотке крови повышаются в 40-60% случаев, в то время как во второй фазе заболевания уровень обоих ферментов имеет тенденцию к снижению [145]. Повышение уровня АСТ и нормальный уровень АЛТ отмечен в первые дни инфицирования обезьян вирусом ВОГЛ [26].

В ходе нашего эксперимента мы измеряли биохимические показатели в сыворотках крови обезьян: аланинаминотрансферазу (alanine aminotransferase - ALT), аспартатаминотрансферазу (aspartate aminotransferase - AST), глюкозе (glucose - GLU), щелочную фосфатазу (alkaline phosphatase - ALP), общий белок (total protein - TP), альбумин (albumin - ALB), мочевины в крови (blood urea - BUN), общий билирубин (bilirubin total - BILT), лактатдегидрогеназу (lactate dehydrogenase - LDH), фосфат (phosphate - PHOS), кальций (calcium - CA), триглицерид (triglycerides - TRIGL), холестерин (cholesterol - CHO), гамма-глутамилтрансферазу (gamma-glutamyl transferase - GGT), амилазу (amylase - AMYL), панкреатическую амилазу (pancreatic amylase - AMY-P) и железо (iron - IRON). По результатам анализа не наблюдали существенных изменений биохимических показателей на вторые, четвертые и седьмые сутки после заражения в сравнении с показателями до заражения (Таблица 14).

Таблица 14 – Биохимические показатели крови исследуемых животных

обезьяны	Д.П.И.	GLU (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	TP (g/L)	ALB (g/L)	BUN (mmol/L)	BILT (umol/L)	PHOS (mmol/L)	CA (mmol/L)	TRIGL (mmol/L)	CHO (mmol/L)	GGT (U/l)	AMYL (U/L)	AMY- P (U/L)	IRON (umol/L)
КЭ-1	до инф	7,68			1940,8		31,72	3,11		1,57	2,45	1,4	4,59		372,5	288,5	19
	2	3,86	17		2037,2	75,6	35,3	4,22		0,91	2,37	0,6	3,8	132	366,1	294,2	22,8
	4	5,58	15,8	81,1	1811,4	68,7	36,2	6,03	2,4	0,85	2,46	0,29	3,37	111,5	408,7	315,9	17
	7	3,06	32,2		1413,4	72,4	35,46	4,97		0,79	2,4	0,29	3,84	98,2	398,3	312	293,6
КЭ-2	до инф	4,9		40,5	406,4		33,2	3,06	2,4	1,27	2,69	1,5	6,5		217,7	151,1	21,5
	2	3,51	35,2		392	80,3	36,05	2,95		1,42	2,46	1,29	5,63	119,6	197,7	147,4	19,6
	4	3,93	25,8	55,4	338,6	73,1	35,45	3,49	4,3	0,99	2,41	0,76	4,74	107,1	205,1	143,8	10,8
	7	2,71	24,2	60,1	333,3	77,5	35,05	2,98	3,9	0,76	2,51	0,86	4,49	107	156	108,2	19,9
КЭ-3	до инф	6,34		30,7	108,7		36,08	3,13	4,6	1,64	2,46	1,5	4,78		336,7	242,9	18,5
	2	4,86	24,8	23,6	89,5	81,2	38,53	3,32	7,2	0,99	2,34	0,43	3,48	36,1	351,4	254	9,9
	4	3,8	30,1	23,7	75,7	81,2	37,67	3,79	4,6	1,35	2,44	0,66	2,95	36,9	383,6	294,8	20,6
	7	3,64	24	27,9	74,5	88,1	37,51	3,13	3,2	1,19	2,45	0,82	3,12	37,3	358,6	313,5	9,9
П-2	до инф	8,72			146,8		33,93	4,85		1,93	2,44	2,38	6,2		376,2	249	25,9
	2	4,2	22,7		141,3	82,2	38,1	5,01	1,3	1,28	2,43	1,12	5,63	47,9	306	213,9	21,8
	4	4,18	20,1	34,4	117,3	78,5	37,99	5,62	5	1,3	2,46	0,89	5,07	47,3	309,9	222,8	18,5
	7	4,59	24,2		124,5		41,35	6,43	2	1,63	2,75	1,42	5,53	60,9	357,1	248,1	24,7
П-3	до инф	6,67			308,5		17,58	3,97		1,39	2,07	0,67	2,15		704,5	350,5	5,6
	2	3,64	13,6	27,1	254,3	73,1	20,56	2,96	3,9	0,5	2,04	0,68	2,13	36,2	483,5	246	17,4
	4	3,86	14,4	21,5	192,4	73,2	21,35	3,9	2,8	0,74	2,11	0,52	2,37	37,5	559,9	287,7	2,11
	7	4,38	14,8	40,4	196,8	80	21,47	2,97	0,6	0,62	2,06	0,95	2,49	38,3	625,1	287,4	11,7
П-1	до инф	6,5		53,7	273,5		33,26	3,5	0,9	1,9	2,38	0,65	5,56		973,6	645,8	24,3
	2	4,87	12,3	36	337,5	72,4	36,49	2,51	5,4	1,49	2,3	1,05	5,37	103,8	686,5	462,3	21,9
	4	6,41	14,9	36,1	277,7	72,2	36,94	2,44	4,6	1,46	2,3	0,82	5,26	101,7	631,4	481,1	12,9
	7	5,1	14,7	39,4	267,8	82,9	39,79	2,87	4,3	1,43	2,48	0,53	3,84	46,9	792,4	635,8	17,1

Продолжение таблицы 14

Обезья- ны	Д.П.И.	GLU (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	TP (g/L)	ALB (g/L)	BUN (mmol/L)	BILT (umol/L)	PHOS (mmol/L)	CA (mmol/L)	TRIGL (mmol/L)	CHO (mmol/L)	GGT (U/l)	AMYL (U/L)	AMY- P (U/L)	IRON (umol/L)
в П-1	до вак	5,56		61,2	242,1	79,9	29,71	3,72	1,3	1,12	2,81	0,52	6,05		474,7	362,6	24,2
	До зар	7,99	28,5	48,6	443,3		39,7	5,68	3,2	1,51	2,53	0,67	8,9	72,8	437,1	294,4	20,3
	2	5,42	18,1	34,9	342	71	34,08	2,3	4,3	1,04	2,3	0,6	5,38	76,5	328	265,8	15
	4	6,69	21,3	49,6	300,4	73	34,78	3,67	2,4	1,1	2,33	0,53	5,1	68,5	382,9	332,3	15,3
	7	5,94	19,9	32	273,9	81,6	35,68	1,76	2,8	1,04	2,41	0,6	5,5	70,4	376	313,5	9,9
в П-2	до вак	6,14			328,2	84,6	36,97	5,35		1,61	2,61	1,65	7,39		465,4	334,1	22
	До зар	8,84	18,7	38,4	352		33,14	3,11	3,9	1,3	2,38	0,53	5,58	80,7	371,7	295,2	15,7
	2	4,93	41,8		377,1	79,7	41,05	4,25		1,54	2,27	0,63	7,9	78,6	352,6	240,8	25,6
	4	7,81	35,5	37,3	325,2	78,9	43,39	4,6	2,4	1,16	2,48	0,34	9,19	70,1	363	272	-
	7	7,07	34,4	39,8	329,9	82,3	42,03	5,69	3,5	1,23	2,55	1,22	8,68	69,6	414,9	303,5	20,3
КЭ+П-2	до инф	3,31		47,9	234,6		35,62	3,91	3,2	1	2,55	0,66	2,91		397,4	287,8	7
	2	3,47	43,2		258,3	78,8	36,14	2,77	1,3	0,94	2,3	0,36	3,11	76,8	335,9	253,5	7,6
	4	4,09	33,4	31,6	214,8	76,5	34,79	4,12	1,7	0,82	2,3	0,36	3,02	70,4	330	252,9	22,5
	7	4,05	52,1	43,5	211,4	80	33,91	3,2	2,8	0,91	2,22	0,39	2,89	66,5	341,8	249,6	22,1
КЭ+П-1	до инф	5,87		39,9	91,2		35,98	5,36	2	1,7	2,59	1	4,15		516,9	310,7	22,8
	2	4,97	36,9	31,5	90,8	78,4	41,67	6,13	2,8	1,17	2,52	0,47	5,26	66,2	430,6	271,7	28,2
	4	5,89	34,9	35,3	75,3	74,8	40,71	7,54	2,4	1,2	2,34	0,5	5,35	60,4	358,8	222,8	13,6
	7	4,35	33,9	62,6	73,2	79,2	40,89	4,86	1,7	1,08	2,51	0,43	5,54	61,5	419,4	252,3	9,5
К-1	до инф	6,39		52,8	2886,8		34,17	4,76	2	2,04	1,88	1,42	4,24		664,5	475,2	23,7
	2	4,16	20,7	48,8	3006,6	76,9	39,8	4,64	0,9	1,93	1,78	0,77	5	129,1	589	455,7	17
	4	4,03	23,8	53,7	2559,5	73,2	40,48	5,47	2,8	1,82	1,69	0,67	5,18	131,2	518,8	390,4	16,5
	7	3,65	25	61,1	2568,6	79,6	38,74	4,98	2	1,5	1,71	0,72	5,05	123,9	528,4	376,9	17,9
К-2	до инф	4,3		43,3	468,2		33,31	5,16	2,8	1,2	2,6	1,26	5,12		412,2	352,3	25,9
	2	4,53	29,2	32,4	517,4	74,1	36,57	5,92	1,7	0,95	2,38	0,91	3,89	47,8	387,2	341,4	13,4
	4	4,4	22,9	24,9	409,8	72,2	36,97	5,07	2,8	0,91	2,39	0,47	3,72	46,8	408	345,4	13,8
	7	5,61	23	22,1	424,6	82,1	37,75	6,14	1,7	0,62	2,51	0,72	3,84	46,9	360,6	293	17,1

3.3.3 Вирусная нагрузка в крови и органах обезьян вида *Macaca fascicularis* после заражения ВКЭ, ВПОВ и смешанной инфекции ВКЭ и ВПОВ.

Уровень виремии для ВКЭ и ВПОВ у инфицированных обезьян определяли в сгустках крови, поскольку ранее было показано, что количество вируса, обнаруженное в сгустках крови и в сыворотке обезьян, эквивалентно [26]. Культуру клеток СПЭВ заражали 10%-ной суспензией кровяных сгустков и через 48 часов после заражения исследовали наличие вируса в культуральной жидкости (КЖ). Поскольку эритроциты могут мешать проведению анализа, для повышения вероятности обнаружения вируса в КЖ использовали три метода: метод бляшек в культуре клеток СПЭВ, ВКЭ- или ВПОВ-специфическую ПЦР в РВ, позволяющую дифференцировать вирусные геномы в смешанных образцах [202] и ИФА для выявления антигена ВКЭ с помощью коммерческого набора Вектор ВКЭ-антиген (Вектор-Бест, Россия). Образец считался положительным, если вирус был обнаружен хотя бы одним из методов. Несмотря на отсутствие видимых признаков заболевания, виремия была обнаружена у всех невакцинированных обезьян на 2 день после инфекции по данным титрования КЖ по бляшкам. На 4 сутки ВКЭ был выделен у двух животных из группы, заражённой ВКЭ, и снова у Т+Р-2. В группе обезьян, заражённых ВПОВ, вирус не был обнаружен на 4 сутки. ВПОВ выявлялся в крови всех обезьян методом ПЦР в РВ, и ни у одной из двух обезьян, вакцинированных против КЭ (Таблица 15).

Таблица 15 – Виремия у ВКЭ- и/или ВПОВ-инфицированных обезьян, выявленная с помощью анализа бляшек, ПЦР в РВ и ИФА

Группы	№ обезьяны	БОЕ	ВКЭ-АГ ИФА	ВПОВ-ПЦР в РВ, lg(κДНК) /мл	ВКЭ-ПЦР в РВ, lg(κДНК) /мл	БОЕ	ВКЭ-АГ ИФА	ВПОВ-ПЦР в РВ, lg(κДНК) /мл	ВКЭ – ПЦР в РВ, lg(κДНК) /мл
<u>2 д.п.и.</u>						<u>4 д.п.и.</u>			
ВКЭ	КЭ-1	+	-	н.т.	-	-	-	н.т.	5.07
	КЭ-2	+	-	н.т.	-	+	+	н.т.	6.83
	КЭ-3	+	-	н.т.	5.84	+	-	н.т.	-
ВПОВ	П-1	+	-	6.06	н.т.	-	-	-	н.т.
	П-2	+	-	5.26	н.т.	-	-	-	н.т.
	П-3	+	-	6.63	н.т.	-	-	-	н.т.
ВПОВ+ ВКЭ	КЭ+П-1	+	-	4.78	-	-	-	-	-
	КЭ+П-2	+	+	4.66	5.00	+	+	-	-
Вак+ ВПОВ	ВП-1	-	-	-	н.т.	-	-	-	н.т.
	ВП-2	-	-	-	н.т.	-	-	-	н.т.

"+" - положительный, "-" - отрицательный, н.т. – не тестировался.

Как было описано ранее, виремия у макак после подкожного заражения ВКЭ и ВОГЛ обычно наблюдается между вторым и седьмым днями, в то время как вирус может быть обнаружен в органах и ЦНС на 8-10-й день и не определяться в ЦНС к 20-му дню [26].

В нашем исследовании вирус не был обнаружен в мозге зараженных животных ни в одной из исследуемых групп на 10-14 сутки после заражения. Однако у нескольких животных вирусная РНК была обнаружена методом ПЦР в РВ на 10-14 сутки в селезенке и лимфатических узлах. ВКЭ был обнаружен в лимфатических узлах у двух ВКЭ-инфицированных обезьян (КЭ-1 и КЭ-3) и в селезенке только у КЭ-1. В группе, инфицированной ВПОВ, вирус был обнаружен у одной обезьяны (П-1) в селезенке и лимфатических узлах. В группе приматов со смешанной инфекции ВКЭ и ВПОВ в селезенках обеих обезьян был обнаружен только ВКЭ (Таблица 16). У вакцинированных животных вирус в органах не детектировался.

Следовательно, смешанная инфекция ВПОВ и ВКЭ привела к активной репродукции обоих вирусов, так как ВКЭ и ВПОВ были обнаружены в крови одной из инфицированных обезьян и перекрестно-реактивные НАТ против обоих вирусов активно вырабатывались во время заражения, в то время как в селезенке исследуемых обезьян был обнаружен только ВКЭ.

Таблица 16 – Наличие ВКЭ и/или ВПОВ в селезенке, лимфатических узлах и мозге инфицированных обезьян

группы	ВКЭ			ВПОВ			ВКЭ+ВПОВ				вак+ВПО В	
№ обезьяны	КЭ 1	КЭ 2	КЭ 3	П-1	П-2	П-3	Т+Р-1		Т+Р-2		ВП 1	ВП 2
органы	lg(кДНК ВКЭ)/мл			lg(кДНК ВПОВ)/мл			lg (кДНК ВКЭ)/мл	lg (кДНК ВПОВ)/мл	lg (кДНК ВКЭ)/мл	lg (кДНК ВПОВ)/мл	lg (кДНК ВПОВ)/мл	
Селезенка	4,97	-	-	4,53	-	-	4,07	-	4,4	-	-	-
Лим-ие узлы	3,46	-	4,2	4,85	-	-	-	-	-	-	-	-
мозг	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Количество вируса определяли методом ПЦР в РВ, число копий вирусной РНК выражали в lg(кДНК)/мл 10%-ной суспензии органов. Красным отмечены особи, подвергшиеся эвтаназии на 10 сутки, оранжевым - на 11 сутки, зеленым - на 14 сутки. “-” – РНК не детектирована.

3.3.4 Показатели крови обезьян вида *Macaca fascicularis* после заражения ВКЭ, ВПОВ и смешанной инфекции ВКЭ и ВПОВ

Было показано, что у людей с острым КЭ количество лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов и тромбоцитов в крови снижается в первой фазе заболевания и нормализуется или повышается во второй фазе [145,223]. Аналогичных данных о клещевых ортофлавивирусных инфекциях, протекающих без видимых признаков, для людей и приматов нет. У обезьян, инфицированных близкородственным к ВКЭ вирусом ОГЛ, на фоне геморрагического синдрома была обнаружена лейкопения и тромбоцитопения на восьмой день после заражения [26].

У инфицированных ВКЭ и ВПОВ невакцинированных обезьян по сравнению с контрольной группой на 2, 4 и 7 сутки наблюдалось значительное повышение уровня моноцитов (Рисунок 26 А). Значения количества моноцитов для обезьян, в сыворотках которых были определены предсуществующие НАТ к ортофлавивирусам (для обезьяны КЭ-2 НАТ к ортофлавивирусам были выявлены до эксперимента, а у обезьяны П-3 по результатам динамики НАТ, которые представлены в подразделе 3.4.4, рисунок 31 В, Г, и наличию бустерного ответа к ортофлавивирусам) не были взяты в статистический расчёт, т.к. предсуществующие антитела потенциально могли повлиять на формирование иммунного ответа. У вакцинированных обезьян вП-1 и вП-2 относительный моноцитоз наблюдался на 2 и 4 сутки, соответственно (Рисунок 26 Б). Это может свидетельствовать о развитии воспалительного процесса в ответ на инфекцию.

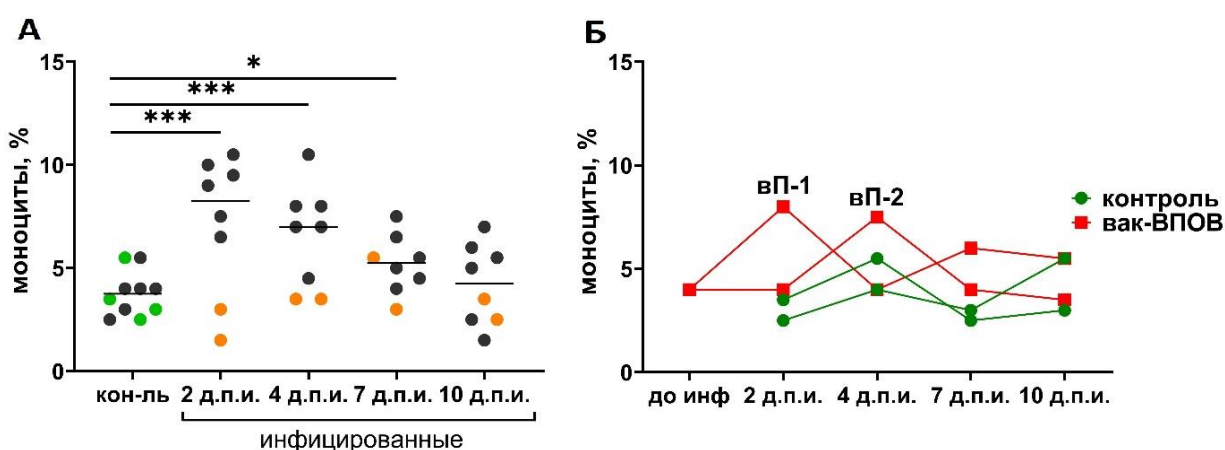


Рисунок 26 – Процентное содержание моноцитов в периферической крови животных: а - без предварительной вакцинации. Контрольная группа включает уровни моноцитов у двух неинфицированных обезьян, измеренные во всех временных точках. Цветными точками отмечены обезьяны с предсуществующим иммунитетом к ортофлавивирусам: зелёные – обезьяны К-2, оранжевые - КЭ-2 и П-3 (КЭ-2 и П-3 не были взяты в статистический анализ). “—” – медиана. Статистическая обработка по критерию Манна-Уитни, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; б - динамика уровня моноцитов в группе обезьян, иммунизированных вакциной КЭ с последующим инфицированием ВПОВ (красный) и контрольных неиммунизированных и незаражённых обезьян (зелёный)

Значительных различий в количестве лимфоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов в крови зараженных животных в сравнение с незараженным контролем не наблюдалось (Рисунок 27).

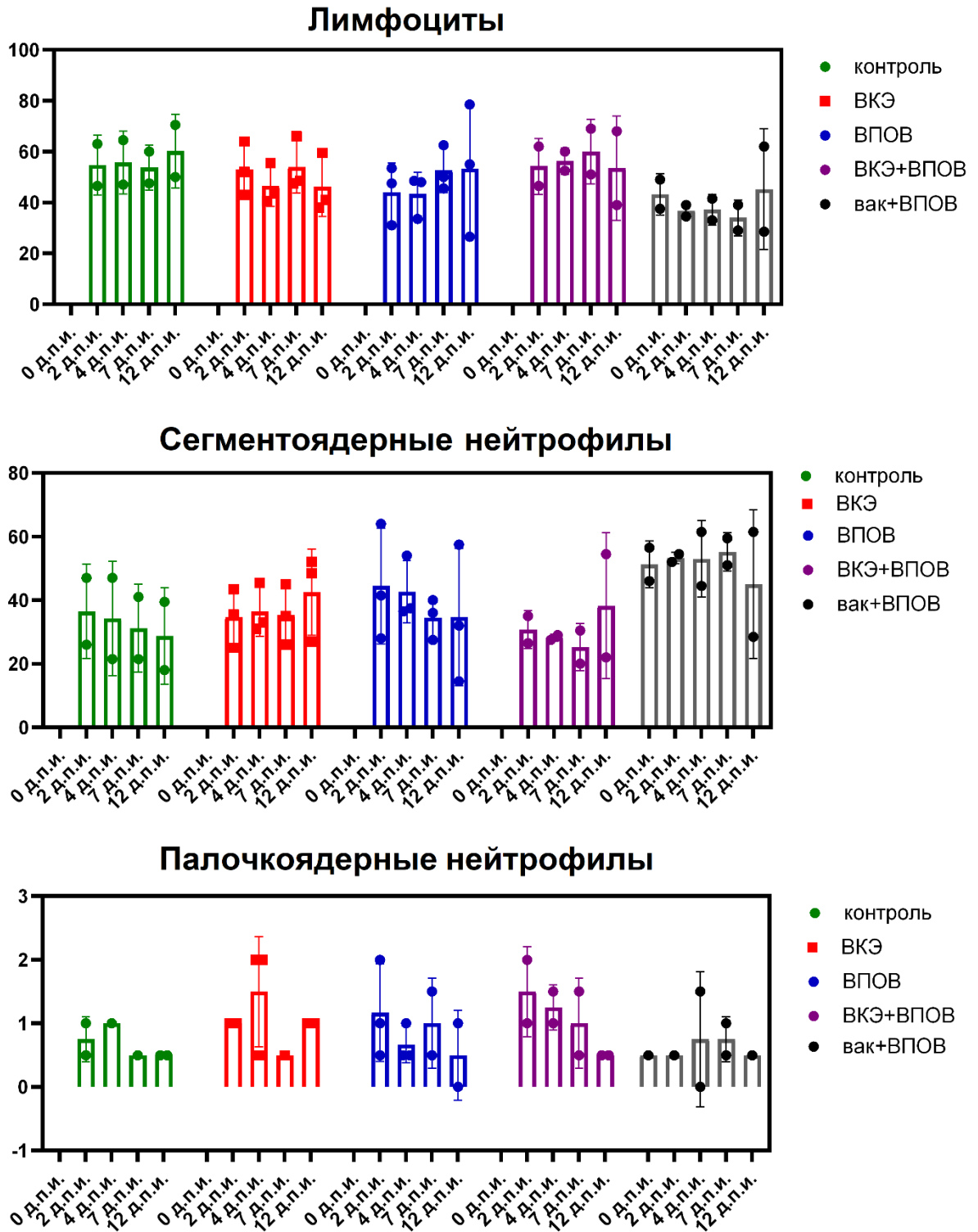


Рисунок 27 – Количество лимфоцитов, моноцитов, сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов в мазках крови исследуемых животных на 0, 2, 4 и 7 день после заражения. Разброс представлен $\pm$ SD

В условиях отсутствия клинических признаков заболевания, мы также не наблюдали изменения ПВ на 2-, 4-, 7- и 12-е сутки после инфицирования (Рисунок 28)

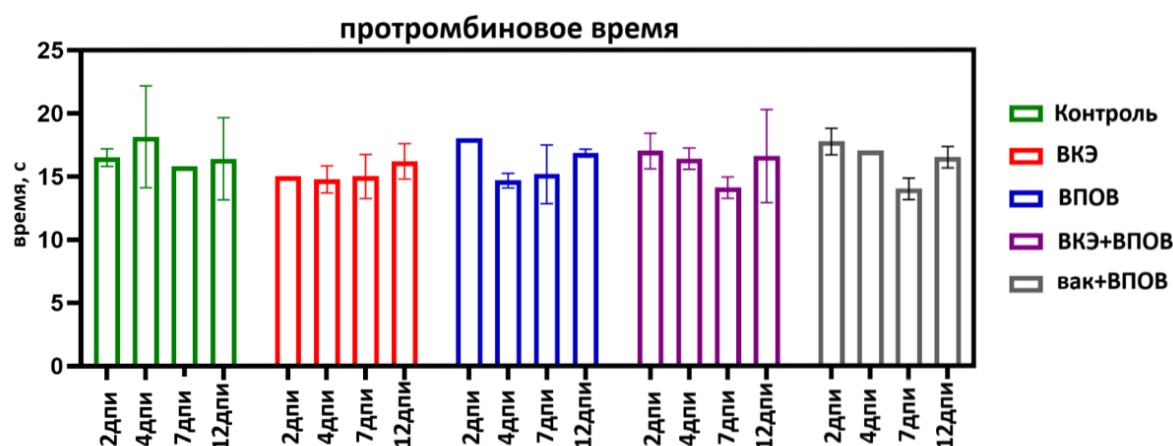


Рисунок 28 – ПВ обезьян на 2, 4, 7 и 12 день после заражения. Разброс представлен средними значениями $\pm$ SD

3.3.5 Определения ИФНа в сыворотках крови обезьян вида *Macaca fascicularis* после заражения ВКЭ, ВПОВ и смешанной инфекции ВКЭ и ВПОВ

Наличие ИФН I типа в сыворотке крови является важной характеристикой активации врожденного иммунного ответа. Для людей показано повышение уровня ИФНа в сыворотке крови во время острого КЭ [145,224]. Однако почти нет данных об уровне ИФНа у обезьян при ортофлавивирусных инфекциях.

Мы измерили уровень ИФН- α в сыворотках исследуемых животных на 2, 4, 7 и 10 сутки. Уровни ИФН- α в сыворотках обезьян представлены на тепловой карте (Рисунок 29). Небольшое количество исследованных животных не позволило выявить статистически достоверных различий в уровнях ИФН- α . Тенденция к повышению наблюдалась у обезьян, инфицированных ВПОВ (П-1, П-2, П-3). Среди животных, зараженных ВКЭ, смесью ВКЭ и ВПОВ или вакцинированных против ВКЭ и зараженных ВПОВ, изменений в уровне ИФН - α не наблюдалось.

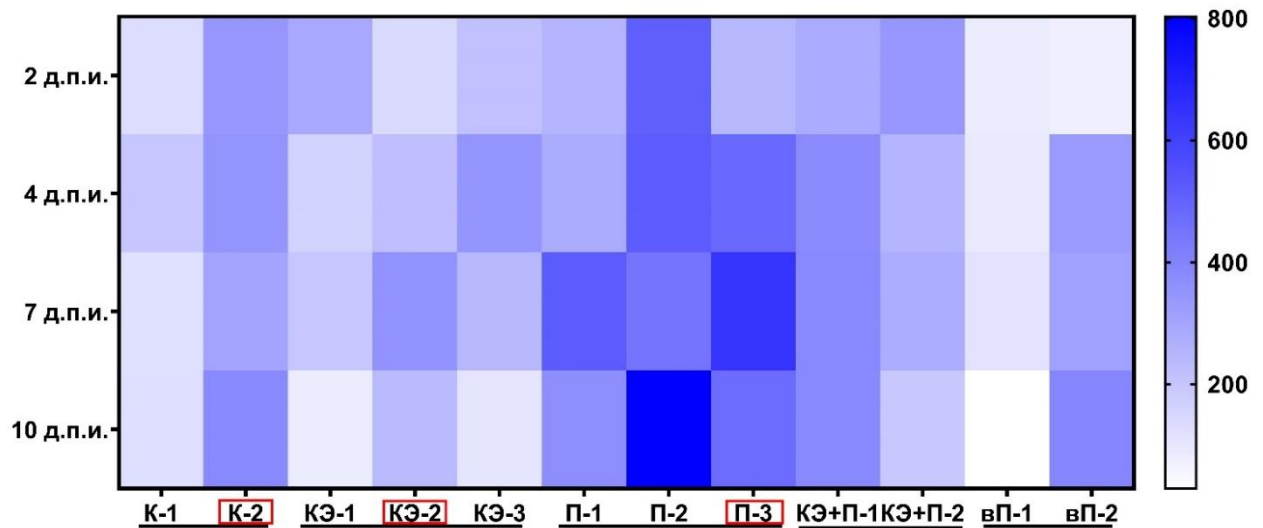


Рисунок 29 – Уровни ИФН-α (пг/мл) в сыворотках инфицированных обезьян на 2, 4, 7 и 10 сутки после заражения. По горизонтальной оси указаны животные, по вертикальной шкале - дни после заражения; красным выделены животные с предсуществующим иммунитетом к ортофлавивирусам

Известно, что различные вирусы и штаммы одного и того же вируса могут различаться как по чувствительности к ИФН α , так и по их способности подавлять/индуцировать ИФН α [4]. Это говорит о том, что штамм ВКЭ ЭК-328, используемый при заражении, может лучше подавлять индукцию ИФН α , чем тестируемый штамм ВПОВ. Альтернативно, эти результаты могут быть объяснены различной динамикой вирусного размножения исследуемых вирусов и времени их появления в сыворотке.

3.3.6 Динамика титров НАТ в крови обезьян вида *Macaca fascicularis* после заражения ВКЭ, ВПОВ и смешанной инфекции ВКЭ+ВПОВ

Для характеристики гуморального иммунного ответа на ортофлавивирусную инфекцию в сыворотках обезьян были измерены уровни НАТ как к ВКЭ, так и к ВПОВ на разные сроки после заражения: на вторые, четвертые, шестые и 10-14-е сутки.

У обезьян КЭ-1 и КЭ-3, зараженных ВКЭ, НАТ против ВКЭ появились после 4 суток. У КЭ-2, которая уже имела предсуществующие НАТ против ортофлавивирусов, НАТ к ВКЭ детектировались уже на вторые сутки после заражения. У КЭ-1 и КЭ-2 на 7-е сутки были выявлены перекрестно-реактивные НАТ против ВПОВ (рис 30 А, В). В сыворотке крови КЭ-3 не было обнаружено перекрестно-реактивных НАТ к ВПОВ во всех исследуемых временных точках.

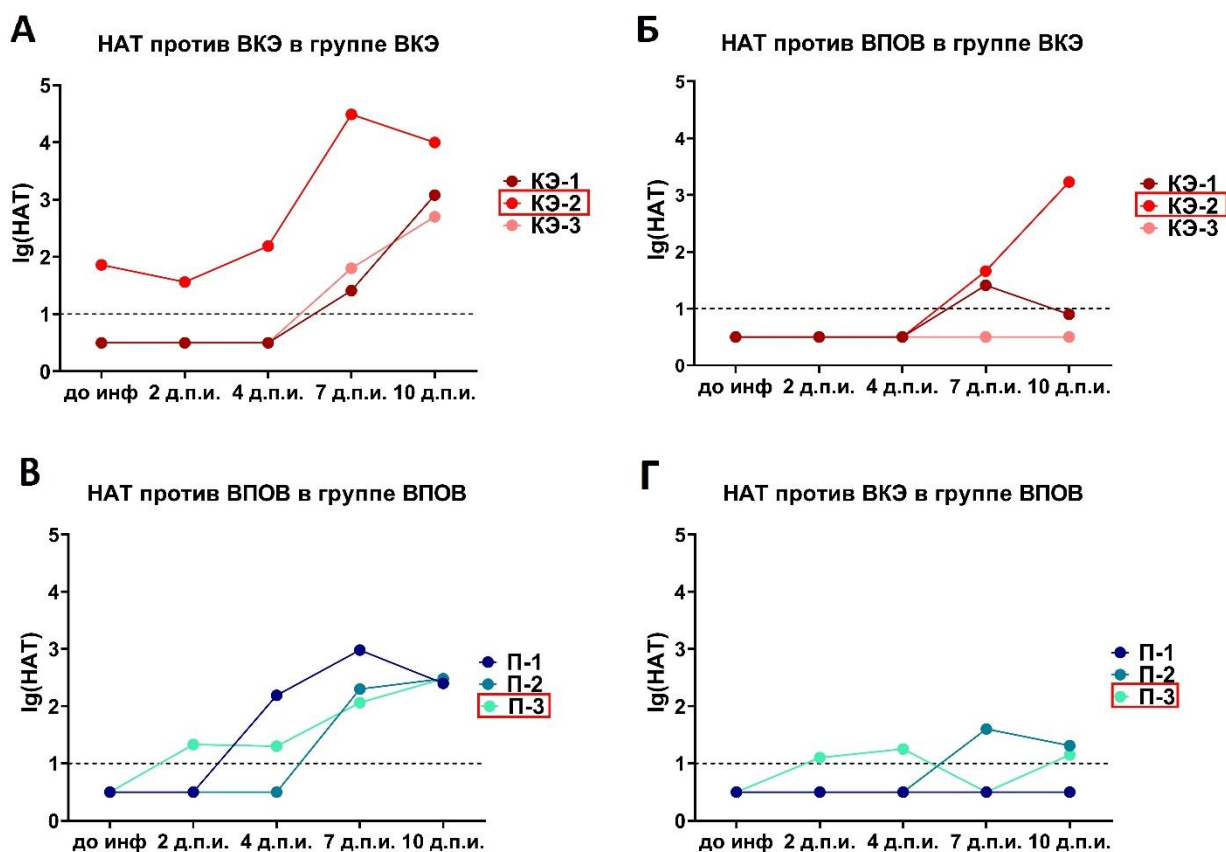


Рисунок 30 – Титры НАТ в сыворотках обезьян, заражённых ВКЭ (А, Б) и ВПОВ (В, Г). Пунктирной линией обозначен предполагаемый минимальный защитный титр НАТ. В сыворотках с титром НАТ ниже 1 lg условный титр принимали равным 0,5 lg. Для анти-ВКЭ НАТ SD=0,18 (измерено для положительной контрольной сыворотки анти-ВКЭ, не показано), для анти-ВПОВ НАТ SD=0,20 (измерено для положительной контрольной сыворотки анти-ВПОВ, не показано). Красными рамками отмечены обезьяны с предсуществующими НАТ к ортофлавивирусам

У животных из группы, зараженной ВПОВ (группа ВПОВ: обезьяны П-1, П-2 и П-3), наблюдалась различная динамика НАТ против гомологичного вируса для каждого примата: у П-3 титры НАТ против ВПОВ повышались ко вторым суткам, у П-1 - к четвертым суткам, а у П-2 - к седьмому дню после заражения (Рисунок 30 С). У обезьяны П-3 титры НАТ против ВПОВ начали повышаться раньше 2-х суток, что позволяет предположить, что П-3 также имела предсуществующий иммунитет к ортофлавивирусам, но в наших анализах до начала эксперимента не определялись. Перекрёстные НАТ к гетерологичному ВКЭ в сыворотках крови животных, зараженных ВПОВ, детектировались в очень низких значениях и были обнаружены у П-3 на 2-е сутки и у П-2 на 7-е сутки, и не были обнаружены у обезьяны П-1 (Рисунок 30 В, Г).

Эти результаты свидетельствуют о том, что после заражения ВКЭ или ВПОВ могут индуцироваться перекрестно-реактивные антитела к гетерологичному вирусу, однако это зависит от стадии заражения и индивидуальных особенностей животного.

В группе, зараженной смесью вирусов (ВКЭ+ВПОВ), динамика НАТ была схожа с картиной, наблюдаемой при моноинфекции, вызванной этими вирусами. В сыворотке крови обезьян КЭ+П-1 титры НАТ против обоих вирусов начали повышаться на четвертые сутки, а у КЭ+П-2 - на седьмой день после заражения. Однако на 10-е сутки у КЭ+П-2 титры НАТ против ВКЭ выросли до более высоких значений, чем титры против ВПОВ (Рисунок 31).

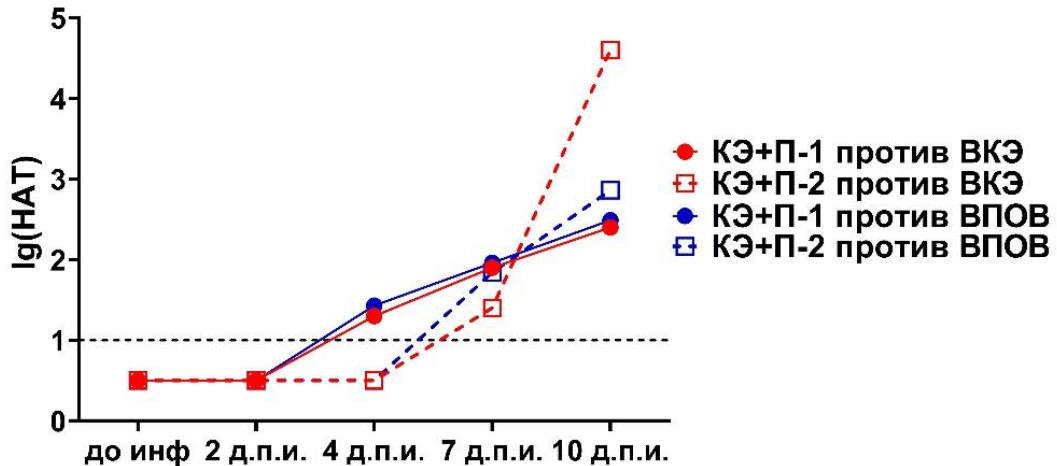


Рисунок 31 – Титры НАТ против ВКЭ (красные линии) и ВПОВ (синие линии) в группе (ВКЭ+ВПОВ). Пунктирной линией обозначен предполагаемый минимальный защитный титр НАТ. В сыворотках с титром НАТ ниже 1 lg условный титр принимали равным 0,5 lg. Для анти-ВКЭ НАТ SD=0,18 (измерено для положительной контрольной сыворотки анти-ВКЭ, не показано), для анти-ВПОВ НАТ SD=0,20 (измерено для положительной контрольной сыворотки анти-ВПОВ, не показано)

3.3.7 Динамика титров НАТ в крови обезьян вида *Macaca fascicularis* предварительно иммунизированных вакциной КЭ и заражённых ВПОВ

Титры НАТ против ВКЭ в сыворотках привитых вакциной КЭ обезьян (вП-1 и вП-2) были выше 2 lg перед заражением ВПОВ (Рисунок 32). У одного животного до заражения в сыворотке были обнаружены перекрестные антитела против ВПОВ в таком же титре, как и против ВКЭ (вП-2). После заражения ВПОВ мы не обнаружили бустерного иммунного ответа в виде повышения антител на вторые или четвертые сутки ни против ВКЭ, ни против ВПОВ. Напротив, наблюдалась тенденция к снижению титров НАТ против ВПОВ у вП-2 на второй день после заражения. Это можно объяснить связыванием вакцинно-индуцированных антител активно реплицирующимся вирусом и их элиминацией из кровотока. Однако нельзя исключать бустерный ответ: он мог наблюдаться в первый день после заражения, что было показано ранее в другом исследовании [26]. Через четыре дня после заражения наблюдался резкий рост титров НАТ к ВПОВ с пиком на седьмые сутки.

На 10-й день после заражения титры НАТ к ВКЭ продолжали расти, в то время как в отношении ВПОВ наблюдалось небольшое снижение по сравнению с титрами, определенными на седьмой день после заражения. Тем не менее, в сыворотках крови обезьян, инфицированных ВПОВ на всех этапах инфекции титры к обоим вирусам были сопоставимы.

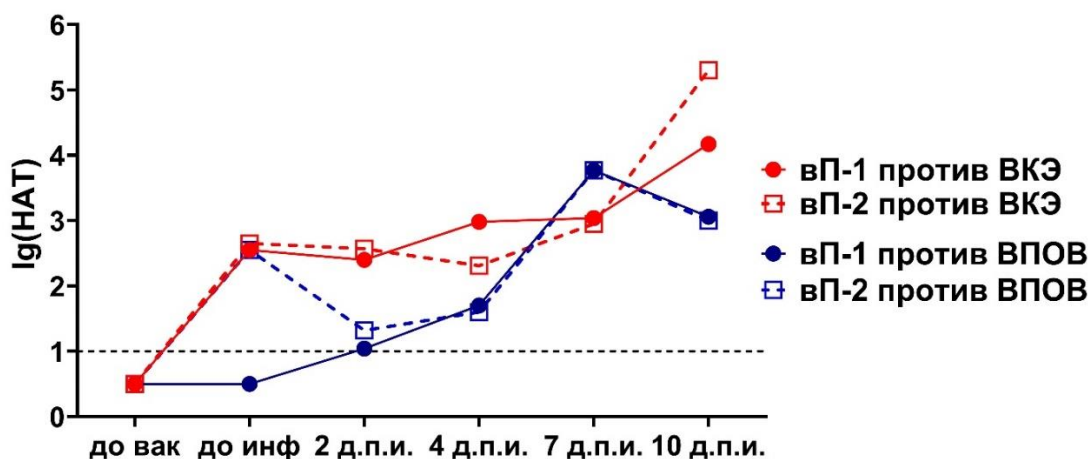


Рисунок 32 – Титры НАТ против ВКЭ (красные линии) и ВПОВ (синие линии) у двух обезьян, вакцинированных против ВКЭ и зараженных ВПОВ (вП-1 и вП-2). Чёрной пунктирной линией обозначен предполагаемый минимальный защитный титр НАТ. В сыворотках с титром НАТ ниже 1 lg условный титр принимали равным 0,5 lg. Для анти-ВКЭ НАТ SD=0,18 (измерено для положительной анти-ВКЭ контрольной сыворотки, не показано), для анти-ВПОВ НАТ SD=0,20 (измерено для положительной анти-ВПОВ контрольной сыворотки, не показано)

3.3.8 Перекрестная реактивность антител после заражения ВКЭ, ВПОВ и предварительно иммунизированных вакциной КЭ с последующим заражением ВПОВ

Известно, что ортофлави вирусы демонстрируют перекрестную реактивность в серологических реакциях [225,226]. Титры перекрестных НАТ в группах обезьян при моноинфекциях ВКЭ и ВПОВ и в группе вакцинированных приматов были проанализированы по отношению титров НАТ ВКЭ к НАТ ВПОВ и наоборот (Рисунок 33). В группе, инфицированной ВКЭ, соотношение НАТ ВКЭ/ВПОВ увеличилось у двух животных (КЭ-1 и КЭ-3) и уменьшилось у животного с ранее существовавшими НАТ к ортофлавирусам (КЭ-2). Напротив, в группе, инфицированной ВПОВ, на 10-е сутки по сравнению с седьмыми сутками соотношение НАТ к ВПОВ/ВКЭ снизилось у двух обезьян (П-1 и П-3), одна из которых, предположительно, имела предсуществующие НАТ к ортофлави вирусам (П-3), и только у П-2 соотношение НАТ ВПОВ/ВКЭ увеличилось на 10-е сутки по сравнению с седьмым днем после заражения ВПОВ (Рисунок 33 А, В). Это позволяет предположить, что спектр НАТ после инфицирования является индивидуальной характеристикой, зависящей от предшествующего иммунитета. При инфекции, вызванной

ВПОВ, синтезируется большая доза НАТ, перекрёстно нейтрализующих ВКЭ, но не наоборот.

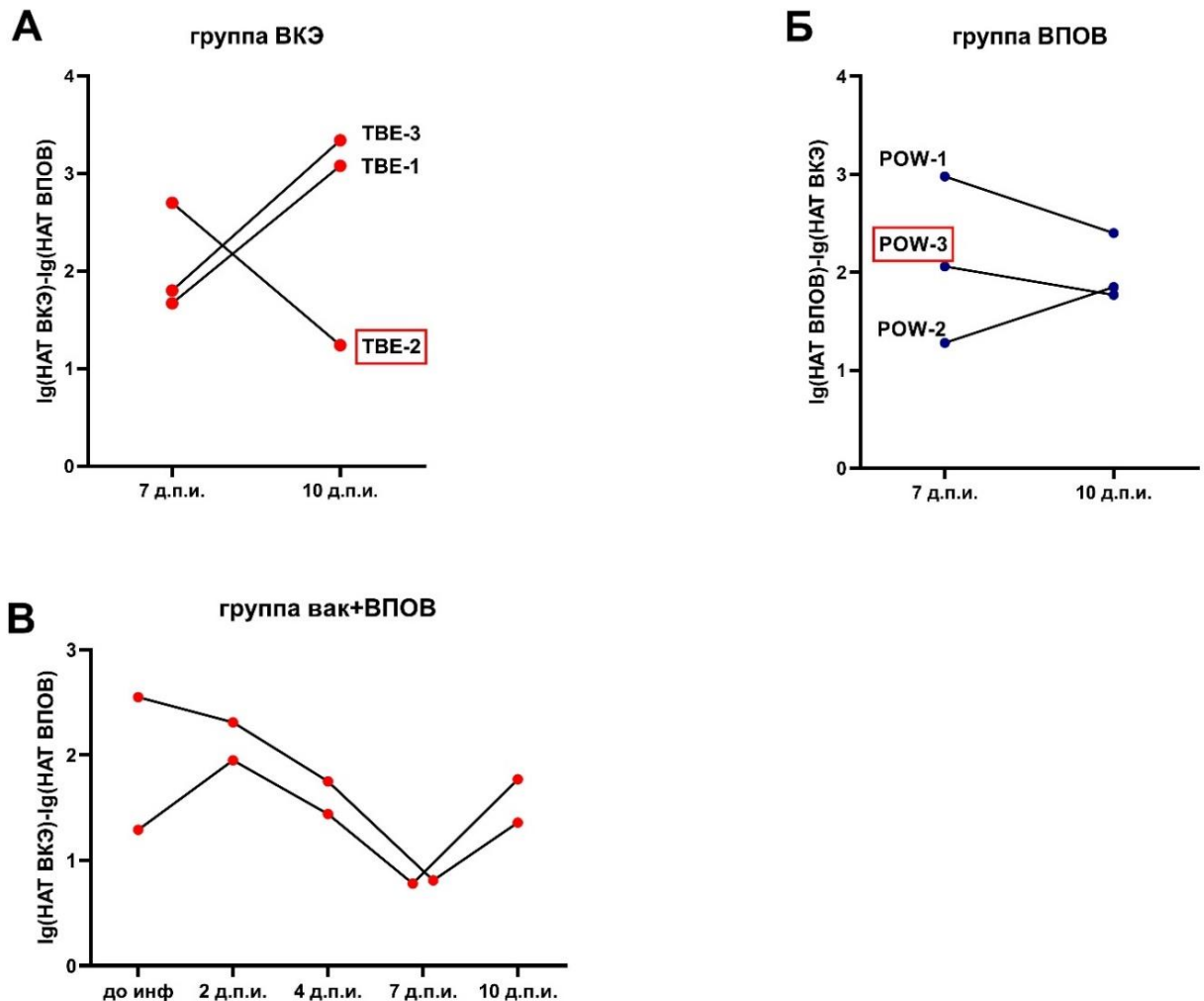


Рисунок 33 – Соотношение НАТ к гомологичному и гетерологичному вирусу в группах, инфицированных ВКЭ и ВПОВ, и у иммунизированных вакциной КЭ животных, зараженных ВПОВ. А) Соотношение НАТ к ВКЭ/ВПОВ в группе, инфицированной ВКЭ, на седьмые и 10-е сутки после заражения. Б) Соотношение НАТ к ВПОВ/ВКЭ в группе, инфицированной ВПОВ, на седьмые и 10-е сутки после заражения. В) Соотношение НАТ к ВКЭ/ВПОВ в группе предварительно вакцинированных приматов, зараженных ВПОВ. Красной рамкой отмечены обезьяны с предсуществующими антителами к ортофлавирусам

До заражения в группе обезьян, предварительно вакцинацированных против КЭ, перекрестные НАТ против ВПОВ были обнаружены только у одного животного, которое также имело высокие титры индуцированных вакциной анти-ВКЭ НАТ. Во время репликации ВПОВ в организме ВКЭ-вакцинированных обезьян наблюдалась индукция перекрестно-реактивных НАТ, нейтрализующих как ВКЭ, так и ВПОВ. Тем не менее, увеличение анти-ВПОВ НАТ было сходно с динамикой, наблюдаемой при моноинфекции. К 14-м суткам, после транзиторного увеличения НАТ против ВПОВ к седьмому дню, мы наблюдали сдвиг в спектре антител в сторону НАТ против ВКЭ (Рисунок 33 С).

Представленные данные указывают на то, что при постановке реакции нейтрализации не всегда возможно определить, какой ортофлаivirus вызвал заболевание, если ранее происходило воздействие других ортофлаivirusных антигенов в виде вируса или вакцины.

3.3.9 Выявление АТ к доменам белка Е ВКЭ в сыворотках обезьян вида *Macaca fascicularis* после заражения ВКЭ, ВПОВ и смешанной инфекции ВКЭ и ВПОВ и предварительно иммунизированных вакциной КЭ с последующим заражением ВПОВ.

Нейтрализующие эпитопы расположены во всех доменах белка Е, но наибольшее их количество находится в третьем домене белка Е (DIII). При этом видоспецифичные эпитопы больше представлены в DIII, а в DI+II белка Е – кроссреактивные [159,160]. Ранее было показано, что сыворотки людей с острым КЭ или после иммунизации вакциной КЭ содержат более высокие уровни АТ к домену DI+II, чем к DIII, в то время как у мышей значительная доля АТ направлена к DIII [161].

Для изучения спектра АТ, индуцируемых у обезьян, при ортофлаivirusной инфекции мы использовали количественный ИФА на основе рекомбинантных белков ВКЭ штамма Сухар, разработанный совместно с лабораторией биохимии ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Данная система дифференцирует АТ к ВКЭ от АТ к другим ортофлаivirusам, включая ВПОВ [205]. В качестве адсорбированных антигенов в ИФА были использованы DIII, объединенные первый и второй домены (DI + II) и растворимый белок Е (sE), включающую все три домена. АТ были выявлены не у всех обезьян, что связано с более низкой чувствительностью метода в сравнение с реакцией нейтрализации. В сыворотке некоторых обезьян с достаточно высокими титрами НАТ были обнаружены антитела ко всем трем вариантам белка (Таблица 16). В группе животных, инфицированных ВКЭ, на 7 и 10 дни антитела были обнаружены только у обезьяны КЭ-2, у которой были предсуществующие НАТ к ортофлаivirusу. В группе, инфицированной ВПОВ, антитела не были обнаружены ни в одной временной точке, несмотря на наличие перекрестнореактивных НАТ к ВКЭ. В группе зараженной смесью вирусов (ВКЭ+ВПОВ), НАТ ко всем трём доменам белка Е ВКЭ были выявлены у обезьяны КЭ+П-2 на 10-е сутки. В вакцинированной группе, зараженной ВПОВ высокие титры антител к DIII, DI + II и sE были выявлены во всех временных точках, за исключением ВП-1 на вторые сутки после заражения.

Таблица 17 – lg(НАТ) к ВКЭ, определённый в реакции нейтрализации и lg(АТ) к доменам DIII, EDI+II, sE ВКЭ, определённый в ИФА

Вирусы	Дни после инфекции	№ обезьяны	lg(НАТ к ВКЭ)	lg(АТ к DIII)	lg(АТ к sE)	lg(АТ к DI+II)
ВКЭ	7	КЭ-1	2,35	-	-	-
		КЭ-2	4,49	3,98	3,9	3,93
		КЭ-3	1,8	-	-	-
	10	КЭ-1	3,23	-	-	-
		КЭ-2	4,4	4,1	4,07	4,68
		КЭ-3	1,84	-	-	-
ВПОВ	7	П-1	1,3	-	-	-
		П-2	1,8	-	-	-
		П-3	-	-	-	-
ВКЭ+ВПОВ	7	КЭ+П-1	1,9	-	-	-
		КЭ+П-2	1,4	-	-	-
	10	КЭ+П-1	1,1	-	-	-
		КЭ+П-2	3,6	3,49	3,32	2,92
Вак+ВПОВ	До инфекции	ВП-1	2,40	3,49	3,33	3,42
		ВП-2	2,70	3,75	3,3	3,53
	2	ВП-1	2,40	-	-	-
		ВП-2	2,57	3,85	3,55	4,77
	4	ВП-1	2,98	4,02	4,02	4,41
		ВП-2	2,31	4,08	3,84	3,6
	7	ВП-1	3,04	4,92	4,84	5,58
		ВП-2	2,95	5,33	4,95	4,62
	10	ВП-1	4,17	4,45	4,6	4,87
		ВП-2	5,30	5,55	5,01	7,82

«-» – ниже предела обнаружения АТ.

По данным, полученным в ИФА для группы предварительно вакцинированных обезьян (ВП-1 и ВП-2), были построены графики, показывающие корреляцию титров АТ к доменам белка Е с титрами НАТ к ВКЭ (Рисунок 34).

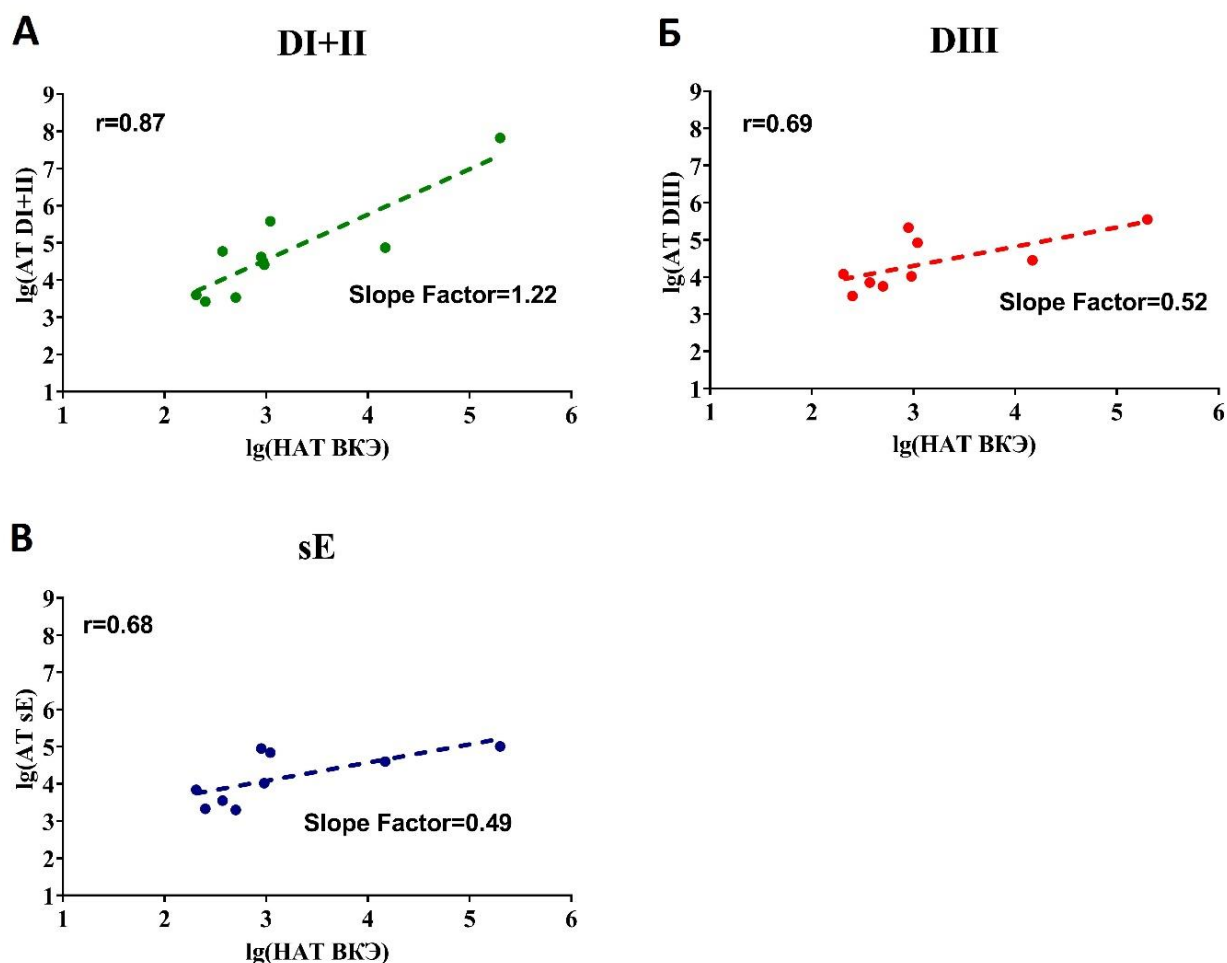


Рисунок 34 – Графики зависимости титра НАТ к ВКЭ по отношению к титрам АТ, поределенным в ИФА на основе DI+II (А), DIII (Б), sE (В) белка Е ВКЭ; r – коэффициент корреляции; прерывистой линией обозначена линия тренда

Титры общих АТ к различным доменам белка Е, определенные в ИФА, находились в прямой корреляции (r) с уровнями нейтрализующих антител к ВКЭ. Наклон прямой (slope factor) свидетельствует о характере зависимости между общими и нейтрализующими АТ, а именно, чем больше угол наклона линии тренда к оси X, тем выше доля ненейтрализующих АТ в общем пуле АТ к этому домену. Представленные графики показывают, что доля ненейтрализующих АТ для DI+II в общем пуле АТ выше (Рисунок 34 А), чем доля ненейтрализующих АТ для DIII или sE (Рисунок 34 Б, В). При условии удаления из расчётов двух последних точек, которые относятся к взятию крови на 10 день после инфицирования для обоих обезьян ВП-1 и ВП-2, коэффициенты корреляции и наклона линии тренда значительно не меняются.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что возраст является одним из факторов, который влияет на течение ортофлавивирусной инфекции. На мышинной модели линии BALB/c при заражении ВКЭ (ЭК-328) дозой 100ЛД₅₀ мышей разного возраста наблюдалось увеличение выживаемости и медианы ПЖ в группе 24-недельных мышей, в сравнении с 14- и 64-недельными. Однако на наличие вируса в ЦНС это не повлияло: в группе 24-недельных мышей вирус в ЦНС детектировали у 100% мышей, как и в группе 64-недельных мышей.

При заражении ВОГЛ мышей линии BALB/c разного возраста, различий в показателях летальности, заболеваемости, медианы ПЖ и процента животных, содержащих вирусную РНК в ЦНС, не наблюдали ввиду высокой вирулентности вируса для данной животной модели.

Наибольшие различия между возрастными группами, отличались у мышей, зараженных ВПОВ. По результатам эксперимента, 64-недельные мыши линии BALB/c старшей возрастной группы были менее чувствительны к инфекции ВПОВ: наблюдалось снижение летальности, однако показатели заболеваемости и обнаружения вируса в ЦНС на 24-28 сутки оставались на высоком уровне по сравнению с показателями у 14-недельных и 24-недельных мышей. На основании этого можно предположить, что с возрастом восприимчивость к вирусу может снижаться, что приводит к понижению летальности, однако возможность перехода инфекции в хроническую форму возрастает. По-видимому, это отличает ВПОВ от ВКЭ, об этом может говорить тот факт, что при смешанной инфекции в ЦНС мы обнаружили только ВПОВ. Тем не менее для подтверждения данного наблюдения необходимы дополнительные исследования. Полученные результаты отличаются от тех, что были представлено в литературе ранее. Инфицирование мышей линии C57BL/6J в возрасте от 10- до 50 недель ВПОВ штаммом LI9, показало увеличение заболеваемости и летальности с возрастом [44]. Это говорит о том, что мыши могут быть моделью для изучения влияния возраста на течение ортофлавивирусной инфекции, однако выбор модели будет зависеть от цели исследования, а также от линии лабораторных мышей и штамма вируса.

ADE зависит от спектра перекрёстнореактивных противовирусных АТ и их количества. Чтобы оценить возможность ADE для ортофлавивирусов, переносимых клещами, были проанализированы изменения спектра НАТ на фоне увеличения сроков после иммунизации вакциной КЭ и возраста животных. Заражение мышей линии BALB/c ВКЭ (сиб), ВОГЛ и ВПОВ проводили на разные сроки после вакцинации, в том числе через месяц после однократной вакцинации и через год после двукратной вакцинации. При

заражении ВЗН использовали разные дозы вируса, чтобы детектировать возможное усиление инфекции.

После однократной и двукратной иммунизации вакциной КЭ через месяц, три месяца и через год количество серопозитивных сывороток, содержащих НАТ к ВОГЛ, было на том же уровне, что и к вакцинному штамму ВКЭ. Такая перекрёстная реактивность поствакцинальных антител может говорить о невозможности определения иммунной прослойки населения к ВОГЛ по наличию соответствующих АТ.

Однократная вакцинация (ВКЭ дальневосточного подтипа) защитила от инфекции ВКЭ (сиб), частично защитила от инфекции ВОГЛ и не защитила от инфекции ВПОВ при заражении через месяц после вакцинации без признаков ADE (раздел 3.1.6, Рисунок 13).

Двукратная вакцинация показала защиту от смертности и заболеваемости при заражении ВКЭ (сиб), ВОГЛ и ВПОВ через месяц и три месяца после последней иммунизации. Через год после двукратной иммунизации вакцина КЭ защитила от летальности и заболеваемости при инфекции ВКЭ (сиб) и ВОГЛ. Так как более возрастные мыши линии BALB/c были менее чувствительны к ВПОВ было невозможно оценить защитные свойства вакцины КЭ от летальности вируса, однако вакцина показала защиту от заболеваемости и предотвратила попадание вируса в ЦНС. Признаков ADE отмечено не было. Таким образом, при оценке эффективности вакцинных и лекарственных препаратов против одного ортофлавивируса надо оценивать и их эффективность относительно близкородственных вирусов. При этом помимо летальности, необходимо также учитывать показатели заболеваемости и наличие вируса в ЦНС для нейротропных инфекций.

После вакцинации против КЭ НАТ к ВПОВ не поднималась ни на одном временном отрезке, более того, мыши, зараженные через месяц после вакцинации, не имели НАТ к ВПОВ даже к 28 суткам, при условии, что вакцина показала защиту от летальности и заболеваемости. Это говорит о том, что отсутствие НАТ не является жёстким показателем неэффективности вакцины. Требуются дальнейшие исследования клеточного иммунитета, обеспечивающего защиту от ВПОВ при иммунизации вакциной КЭ в отсутствие детектируемых НАТ.

Для мышей, предварительно иммунизированных вакциной КЭ и зараженных ВКЭ (сиб), ВОГЛ или ВПОВ на всех исследуемых отрезках времени после инфицирования, НАТ к вакцинному штамму ВКЭ были равны, либо выше титров НАТ к вирусу, используемому при заражении.

Однократная и двукратная вакцинация против КЭ при заражении разными дозами ВЗН (1ЛД₅₀, 10ЛД₅₀ и 100ЛД₅₀) – ортофлавивирусом, переносимым комарами, не показала

защиту через месяц после вакцинации. Однако усиления инфекции в виде повышения летальности или уменьшения продолжительности жизни также не наблюдалось.

Для некоторых ортофлавивирусов, например, ВОГЛ, характерно развитие геморрагического синдрома, поэтому при заражении мышей всеми исследуемыми вирусами проводилось измерение протромбинового времени (ПВ), которое является показателем внешнего пути свертывания крови. На ранних стадиях инфекции исследуемыми вирусами было выявлено, что заражение влияет на внешний путь свертывания крови, но, по-видимому, это не связано с повреждением кровеносных сосудов, а вероятно является следствием увеличения количества ТФ в циркулирующей крови, который в свою очередь может повышаться при действии провоспалительных цитокинов [131]. Мы показали, что наличие предварительной вакцинации против КЭ влияет на показатели ПВ в первые дни после заражения ВОГЛ мышей среднего возраста. Также динамика ПВ зависела от возраста животных и вируса, используемого при заражении.

Наряду с ПВ у молодых 14-недельных мышей, заражённых исследуемыми вирусами, в сыворотках крови были измерены уровни белков СЗА и VAP-1, которые предположительно могут влиять на проницаемость сосудов. Было отмечено понижение концентрации этих белков в сыворотке крови мышей, заражённых ВОГЛ или ВПОВ, что говорит о возможности их использования в качестве маркёров начальных этапов ортофлавивирусной инфекции, вызванной этими вирусами. Определение уровней TNF- α и IL-10 в сыворотках молодых 14-недельных мышей на второй и седьмой день после заражения исследуемыми ортофлавивирусами показало, что для изучения цитокинового ответа и факторов, влияющих на проницаемость сосудов при ортофлавивирусной инфекции, целесообразно использовать мышей зрелого 24-недельного возраста.

Лабораторные мыши являются чувствительной моделью для изучения некоторых ортофлавивирусов и используется для оценки эффективности профилактических и лечебных препаратов, однако она может иметь некоторые ограничения. Так, для мышей показано, что в процессе ортофлавивирусной инфекции в сыворотке крове антитела к доменам I+II белка E практически не детектируются, тогда как именно они могут быть ответственны за ADE. Поэтому мы предположили, что для исследования возможного ADE на фоне иммунизации вакциной КЭ необходимо использовать модель наиболее близкую к человеку по характеру иммунного ответа.

Целью эксперимента на приматах было изучить возможности использования обезьян *Macaca fascicularis* для моделирования начальных стадий инфекции, вызванной ВКЭ и ВПОВ, а также оценить возможное ADE. В эксперименте было выбрано подкожное введение вируса как наиболее приближенное к естественному способу инфицирования при

укусе клеща. Дизайн эксперимента включал такие комбинации инфекции ВКЭ, ВПОВ, и смешанную инфекцию обоими вирусами и инфекцию ВПОВ после двукратной иммунизации вакциной КЭ.

В качестве неожиданного фактора было обнаружено, что у двух предположительно наивных обезьян были предсуществующие НАТ к ВЗН и к ВКЭ в низких титрах. Ввиду возможной перекрестной реактивности и ограничений анализа реакции нейтрализации не было возможности точно подтвердить специфичность этих АТ.

В данной работе при моно- и смешанной инфекции на ранние сроки (2-4 сутки) после инфекции у всех обезьян была детектирована виремия. Вирусная РНК была обнаружена в лимфоузлах и селезенке, что вместе с виремией говорит о продуктивной инфекции. В ЦНС вирус обнаружен не был на 10–14-е сутки, что вместе с отсутствием клинических признаков заболевания свидетельствует об успешном моделировании бессимптомной ортофлавирусной инфекции.

В крови обезьян, вакцинированных против КЭ и инфицированных ВПОВ, не было обнаружено виремии на 2-4 сутки. Кроме того, вирус в органах на 10-14-е сутки также не выявлялся. Это говорит о том, что вакцина КЭ может обеспечивать частичную защиту от инфекции ВПОВ, без признаков ADE, что подтверждается также данными, полученными на мышах. Учитывая, что количество приматов, получивших вакцину, было слишком мало, чтобы сделать надежные выводы, необходимы дальнейшие исследования для подтверждения этого важного наблюдения.

В качестве потенциальных маркеров бессимптомной ортофлавирусной инфекции были исследованы: биохимические показатели, лейкограммы, уровни ИФН-α и ПВ. В данной работе отмечено увеличение количества моноцитов у животных с моно- и смешанной инфекцией, за исключением обезьян с предсуществующими антителами.

Наблюдались некоторые колебания уровней ALT и AST в сыворотках инфицированных животных, но все значения находились в пределах нормальных значений, описанных для *Macaca Fascicularis* [227] и не отличались от контролей. Предположительно эти параметры могут зависеть как от стадии, так и от тяжести заболевания, а также от индивидуальных особенностей животного, что усложняет их интерпретацию и ограничивает их информативность. Другие биохимические параметры значительно не различались между инфицированными и контрольными животными. Уровни IFNα показали тенденцию к увеличению только у обезьян, инфицированных ВПОВ. По результатам эксперимента наиболее информативными маркерами бессимптомной инфекции, вызванной ВКЭ или ВПОВ стали моноцитоз, виремия, повышение уровня ИФН-α.

В результате поведенческих и когнитивных тестов, адаптированных для длиннохвостых макак, и проведенных научным сотрудником лаборатории биологии арбовирусов Роговой Анастасией на исследуемых животных, были выявлены отклонения в поведении и когнитивных способностях приматов на ранней стадии инаппарантной ортофлавивирусной инфекции [200], что вероятнее всего связано с формированием иммунного ответа, а не с возможными прямыми эффектами репликации вируса.

Чтобы охарактеризовать гуморальный иммунный ответ приматов в ответ на инфекцию исследуемыми вирусами, были определены уровни НАТ к ВКЭ и к ВПОВ до заражения и на 2-, 4-, 7- и 10-е сутки после заражения. При моноинфекции ВКЭ и ВПОВ НАТ против гомологичного вируса были обнаружены в группе, инфицированной ВПОВ раньше, чем в группе, инфицированной ВКЭ, совпадая с данными по виремии: более ранним уходом ВПОВ из кровотока.

У двух обезьян с предсуществующими НАТ к ортофлавивирусам наблюдался бустерный ответ после моноинфекции ВКЭ и ВПОВ, причем уровни НАТ увеличивались, начиная со второго дня после заражения, что является слишком ранним показателем для первичной инфекции. Важно отметить, что эта ранняя активация продукции перекрестно-реактивных противовирусных АТ не влияла на виремию, то есть не мешала активной репликации вируса.

По соотношению титров НАТ против гомологичных и гетерологичных вирусов была определена степень перекрестной реактивности АТ к ВКЭ и ВПОВ в сыворотках зараженных обезьян. Определено, что спектр НАТ и их перекрестная реактивность варьировались среди отдельных животных во время моноинфекций и зависели от стадии инфекции у животных с предварительной вакцинацией.

В сыворотках животных, инфицированных ВКЭ, и животных, вакцинированных КЭ и инфицированных ВПОВ, показано наличие АТ к доменам DIII и DI + II белка Е в ИФА, что указывает на некоторое сходство в спектре антител, индуцированных вирусной инфекцией, у человека и макак. Впервые исследованы спектр и динамика образования НАТ после заражения ВПОВ в присутствии предсуществующих индуцированных вакциной КЭ АТ против ВКЭ. Мы показали, что у вакцинированных обезьян в начале инфекции ВПОВ наблюдалось более выраженное увеличение количества антител к DI+II, чем к DIII, а также увеличение количества НАТ к ВКЭ. Наклон линейной зависимости между уровнем НАТ и общим количеством АТ одинаков для DIII и sE и отличается от DI+II, для которого доля, по-видимому, ненейтрализующих антител выше.

В экспериментах на мышах и обезьянах обнаружено, что при инфекции, вызванной ВКЭ, ВПОВ или ВОГЛ образуются перекрёстные АТ. Сроки появления этих АТ и их титры

могут значительно различаться между животными, то есть зависеть от их индивидуальных особенностей. При этом, по-видимому, имеет значение срок после вакцинации и возраст животных.

В связи с существующей вероятностью смешанной инфекции ВКЭ и ВПОВ на Дальнем Востоке, где показана коциркуляция данных вирусов, была смоделирована смешанная инфекция ВКЭ и ВПОВ на мышах и приматах. По результатам экспериментов в мышинной модели в ЦНС у выживших животных детектировали только ВПОВ, с другой стороны, у приматов в органах и крови дольше персистировал ВКЭ, что говорит о том, что у обезьян и мышей при инфекции смесью вирусов конкуренция между ними может быть различной.

Для мышей и обезьян с предварительной иммунизацией вакциной КЭ и зараженных ВКЭ (сиб), ВОГЛ или ВПОВ, наблюдали эффект предсуществующих антител, то есть титр НАТ к вакцинному штамму ВКЭ, был равен или выше титров НАТ к инфицирующему вирусу. Данное наблюдение означает, что при наличии предсуществующего иммунитета к ВКЭ, дифференциальная серодиагностика антигенно близкородственного вируса методом реакции нейтрализации очень затруднительна. Реакция нейтрализации более специфична, чем существующие методы серодиагностики КЭ на основе ИФА с использованием инаktivированных вирионов ВКЭ. Очевидно требуется разработка новых подходов для создания более специфических диагностических систем.

Выводы

1. Выявлены преимущества и недостатки *in vivo* моделей ортофлавивирусных инфекций и определены маркеры для оценки эффективности противовирусных препаратов. Мышиная модель позволяет оценить летальность, заболеваемость и проникновение вируса в ЦНС при острой и персистентной инфекции, вызванной ВКЭ, ВОГЛ или ВПОВ. Выявление виремии, вируса в органах иммунной системы и моноцитоза на приматной модели может быть маркером бессимптомной инфекции, вызванной ВКЭ или ВПОВ.
2. При экспериментальном инфицировании ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ мышей линии BALB/c возраст животных оказывает влияние на протромбиновое время, спектр индуцируемых противовирусных антител и на чувствительность к ВПОВ.
3. В сыворотках обезьян вида *Macaca fascicularis*, инфицированных ВКЭ, ВКЭ+ВПОВ, и обезьян, предварительно иммунизированных вакциной КЭ и заражённых ВПОВ, выявляются антитела к sE, DI + II и DIII белка Е ВКЭ в прямой корреляции с титрами НАТ, при этом доля ненейтрализующих антител в общем пуле антител для DI + II выше, чем этот показатель для DIII и sE.
4. В экспериментах на мышах линии BALB/c вакцина КЭ (на основе дальневосточного подтипа) обеспечивает длительную защиту от ВОГЛ, частичную от ВПОВ и не обеспечивает защиту против ВЗН без признаков антителозависимого усиления инфекции.
5. У животных, предварительно иммунизированных вакциной КЭ и инфицированных ВКЭ (сибирского подтипа), ВОГЛ или ВПОВ, наблюдается эффект предсуществующих антител: титры нейтрализующих антител равны, либо выше к первичному антигену (вакцинному штамму ВКЭ).

Практические рекомендации

1. Для характеристики ортофлавивирусных вакцин необходимо включать испытания в отношении не только специфического вируса, но и в отношении близкородственных вирусов.
2. При оценке эффективности и безопасности препаратов для защиты от нейротропных вирусов помимо летальности необходимо включать учёт заболеваемости и появления вируса в ЦНС лабораторных животных.
3. Для оценки эффективности противовирусных препаратов мыши линии BALB/c являются подходящей моделью по таким маркерам, как летальность, заболеваемость и наличие вируса в ЦНС при остром течении инфекций, вызванных ВКЭ, ВОГЛ и ВПОВ, а обезьяны вида *Macaca fascicularis* являются подходящей моделью по таким маркерам, как моноцитоз, виремия, повышение уровня ИФН- α при бессимптомной ортофлавивирусной инфекции.
4. При инфицировании близкородственными ортофлавивирусами современные методы серодиагностики на фоне иммунизации вакциной КЭ неинформативны, что говорит о необходимости разработки новых подходов для дифференциальной диагностики.
5. Выявленные антитела к DI+DII и DIII белка E ВКЭ в сыворотках инфицированных обезьян вида *Macaca fascicularis* свидетельствует о том, что для моделирования феномена ADE лучше использовать данную модель.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Несмотря на то, что в условиях проведённых экспериментов на фоне поствакцинальных антител к ВКЭ ADE не наблюдалось, остаётся необходимым проведение аналогичных экспериментов *in vitro* для подбора оптимальной модели тестирования профилактических препаратов на возможность защищать от гетерологичного вируса или вызывать ADE. Необходимо дополнительное проведение экспериментов на большем количестве обезьян, в том числе используя ВЗН для инфицирования.

Важной задачей также является изучение поствакцинального клеточного иммунного ответа к ВКЭ в отношении ВПОВ, так как в эксперименте на мышах на фоне отсутствия НАТ к ВПОВ даже через месяц после последней иммунизации вакцина КЭ была эффективна против ВПОВ.

Был проведён пилотный эксперимент по влиянию ортофлавивирусной инфекции на систему коагуляции крови и синтеза цитокинов на ранних стадиях инфекции. Следующей важной задачей является более детальное изучение системы коагуляции крови и факторов, которые могут на нее влиять в процессе ортофлавивирусной ифекции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	– ангиген
АТ	– антитело
БОЕ	– бляшкообразующие единицы
ВДЕН	– вирус денге
ВЖЛ	– вирус жёлтой лихорадки
ВЗИК	– вирус Зика
ВЗН	– вирус Западного Нила
ВКБЛ	– вирус кьясанурской лесной болезни
ВКЭ	– вирус клещевого энцефалита
ВОГЛ	– вирус омской геморрагической лихорадки
ВПОВ	– вирус Повассан
ВЯЭ	– вирус японского энцефалита
ГЛД	– геморрагическая лихорадка денге
ГЭБ	– гематоэнцефалический барьер
ДК	– дендритная клетка
дцРНК	– двуцепочечная РНК
ИФА	– иммуноферментный анализ
КЭ	– клещевой энцефалит
кДНК	– комплементарная ДНК
ЛД50	– пятидесятипроцентная летальная доза
МАТ	– моноклональное антитело
НАТ	– нейтрализующие антитела
НК	– нуклеокапсид
НТО	– нетранслируемый участок
одРНК	– одноцепочечная РНК
ОРС	– открытая рамка считывания
ОТ	-обратная транскрипция
ПАГ	первичный антигенный грех
ПВ	– протромбиновое время
ПЖ	– продолжительность жизни
ПРР	– патогенраспознающий рецептор
ПЦР в РВ	-Полимеразная реакция в реальном времени
РК	– репликативный комплекс

РНК – рибонуклеиновая кислота
СМЖ – спинномозговая жидкость
СПЖ – средняя продолжительность жизни
СПЭВ – клеточная линия почка эмбриона свиньи
ТФ – тканевый фактор
ТМД – Трансmemбранный домен
ЦНС – центральная нервная система
ЦТЛ – цитотоксические лимфоциты
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
ADE – антителозависимое усиление инфекции
ALB - albumin (альбумин)
ALP - alkaline phosphatase (щелочную фосфатазу)
ALT - alanine aminotransferase (аланинаминотрансфераза)
AMYL - amylase (амилазу)
AMY-P - pancreatic amylase (панкреатическую амилазу)
AST - aspartate aminotransferase (аспартатаминотрансферазу)
BILT - bilirubin total (общий билирубин)
BUN - blood urea (мочевину в крови)
CA - calcium (кальций)
CHO - cholesterol (холестерин)
GGT - gamma-glutamyl transferase (гамма-глутамилтрансферазу)
GLU - glucose (глюкозе)
IRON - iron (железо)
LDH - lactate dehydrogenase (лактатдегидрогеназу)
PHOS - phosphate (фосфат)
TP - total protein (общий белок)
TRIGL - triglycerides (триглицерид).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Ruzek D, Avšič Županc T, Borde J, Chrdle A, Eyer L, Karganova G, et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Research* 2019;164:23–51. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2019.01.014>.
- [2] Shapoval A.N. Tick-borne encephalomyelitis. Moscow: Medicine; 1980.
- [3] Barkhash AV, Babenko VN, Kobzev VF, Romaschenko AG, Voevoda MI. Polymorphism of 2'-5'-oligoadenylate synthetase (OAS) genes, associated with predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis, in human populations of North Eurasia. *Molecular Biology* 2010;44:875. <https://doi.org/10.1134/S002689331006004X>.
- [4] Barkhash AV, Perelygin AA, Babenko VN, Brinton MA, Voevoda MI. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis 2011. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.10.017>.
- [5] Yudin NS, Barkhash AV, Maksimov VN, Ignatieva EV, Romaschenko AG. Human Genetic Predisposition to Diseases Caused by Viruses from Flaviviridae Family. *Molekuliarnaia Biologiya* 2018;52:190–209. <https://doi.org/10.7868/S0026898418020039>.
- [6] Shevtsova AS, Motuzova O V., Kuragina VM, Akhmatova NK, Gmyl L V., Kondrat'eva YI, et al. Lethal Experimental Tick-Borne Encephalitis Infection: Influence of Two Strains with Similar Virulence on the Immune Response. *Frontiers in Microbiology* 2016;7:2172. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.02172>.
- [7] Young EE, Sieve AN, Vichaya EG, Carcoba LM, Young CR, Ambrus A, et al. Chronic restraint stress during early Theiler's virus infection exacerbates the subsequent demyelinating disease in SJL mice: II. CNS disease severity. *Journal of Neuroimmunology* 2010;220:79–89. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.01.015>.
- [8] Barkhash AV, Babenko VN, Voevoda MI, Romaschenko AG. Association of IL28B and IL10 gene polymorphism with predisposition to tick-borne encephalitis in a Russian population. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 2016;7:808–12. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2016.03.019>.
- [9] Gabriele Chiffi, Denis Grandgirard, Stephen L Leib, Aleš Chrdle DR. Tick-borne encephalitis: A comprehensive review of the epidemiology, virology, and clinical picture. *Rev Med Virol* 2023;33. <https://doi.org/10.1002/rmv.2470>.
- [10] Klimova E.A., Karetkina G.N., Shakaryan A.K., Sayfullin M.A., Karan L.S., Larichev V.F., et al. West Nile fever on the territory of the Moscow agglomeration. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training* 2021;10:13–21. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-4-13-21>.
- [11] Wagner E, Shin A, Tukhanova N, Turebekov N, Nurmakhanov T, Sutyagin V, et al. First Indications of Omsk Haemorrhagic Fever Virus beyond Russia. *Viruses* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/V14040754/S1>.

- [12] Kovalev S.Y., Okulovskaya V.Y. The First Record of Omsk Hemorrhagic Fever Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus of Baltic Lineage from the Kemerovo Region of Russia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2024;24. <https://doi.org/10.1089/vbz.2023.0156>.
- [13] P Rocco Lasala MH. Tick-borne flaviviruses. *Clin Lab Med* 2010;30:221–35. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.01.002>.
- [14] A H-LC, B J-KC, Tang R-B. Current recommendations for the Japanese encephalitis vaccine. *Journal of the Chinese Medical Association* 2015;78:271–5. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2014.12.009>.
- [15] Leonova G.N., Isachkova L.M., Baranov N.I., Krugliak S.P. [Role of Powassan virus in the etiological structure of tick-borne encephalitis in the Primorsky Kray]. *Vopr Virusol* 1980. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6247844/> (accessed March 24, 2022).
- [16] Bersabeh Tigabu, Terry Juelich, Joseph Bertrand MRH. Clinical evaluation of highly pathogenic tick-borne flavivirus infection in the mouse model. *J Med Virol* 2009;81:1261–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.21524>.
- [17] Noriyo Nagata, Naoko Iwata-Yoshikawa, Daisuke Hayasaka, Yuko Sato, Asato Kojima, Hiroaki Kariwa, Ikuo Takashima, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Tetsutaro Sata HH. The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia. *J Neuropathol Exp Neurol* 2015;74:250–60. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000166>.
- [18] Félix A Rey, Karin Stiasny, Marie-Christine Vaney, Mariano Dellarole FXH. The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO Rep* 2017;19:206–24. <https://doi.org/10.15252/embr.201745302>.
- [19] Slon Campos JL, Mongkolsapaya J, Screaton GR. The immune response against flaviviruses. *Nature Immunology* 2018 19:11 2018;19:1189–98. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0210-3>.
- [20] Wahala M P B Wahala AM de S. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses* 2011;3:2374–95. <https://doi.org/10.3390/v3122374>.
- [21] Růžek D, Dobler G, Mantke OD. Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications. *Travel Medicine and Infectious Disease* 2010;8:223–32. <https://doi.org/10.1016/J.TMAID.2010.06.004>.
- [22] Malkova GB, Chernokhaeva LL, Vorovltch MF, Rogova Y V., Karganova GG. Vaccines based on the Far-Eastern and European strains induce the neutralizing antibodies against all known tick-borne encephalitis virus subtypes. *Вопросы Вирусологии* 2016;61:135–9. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-3-135-139>.
- [23] Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research* 2003;57:129–46. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00206-1](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00206-1).
- [24] A.J. Suckling, H.E. Webb, May Chew-Lim SWO. Effect of an inapparent viral encephalitis on the levels of lysosomal glycosidases in mouse brain. *Journal of the Neurological Sciences* 1976;29:109–16. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(76\)90084-8](https://doi.org/10.1016/0022-510x(76)90084-8).

- [25] Suckling AJ, Bateaian S, Webb HE. A NEW METHOD FOR MONITORING SUBCLINICAL VIRUS INFECTIONS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN MICE. *Br J Exp Path* 1975;56:287.
- [26] Pripuzova NS, Gmyl LV, Romanova LI, Tereshkina NV, Rogova YV, Terekhina LL, et al. Exploring of Primate Models of Tick-Borne Flaviviruses Infection for Evaluation of Vaccines and Drugs Efficacy. *PLoS ONE* 2013;8:61094. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061094>.
- [27] Hambleton P, Stephenson JR, Baskerville A, Wiblin CN. Pathogenesis and immune response of vaccinated and unvaccinated rhesus monkeys to tick-borne encephalitis virus. *Infection and Immunity* 1983;40:995. <https://doi.org/10.1128/iai.40.3.995-1003.1983>.
- [28] Stone ET, Hassert M, Geerling E, Wagner C, Brien JD, Ebel GD, et al. Balanced T and B cell responses are required for immune protection against Powassan virus in virus-like particle vaccination. *Cell Reports* 2022;38:110388. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2022.110388>.
- [29] Rathore APS, Saron WAA, Lim T, Jahan N, St. John AL. Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus-induced microcephaly in fetuses. *Science Advances* 2020;5:1–11. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAV3208>.
- [30] Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nature Publishing Group* 2016. <https://doi.org/10.1038/ni.3515>.
- [31] Valiant WG, Mattapallil JJ. A Simple Flow Cytometry Based Assay to Determine In Vitro Antibody Dependent Enhancement of Dengue Virus Using Zika Virus Convalescent Serum. *J Vis Exp* 2018;57371. <https://doi.org/10.3791/57371>.
- [32] Paul LM, Carlin ER, Jenkins MM, Tan AL, Barcellona CM, Nicholson CO, et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Clinical & Translational Immunology* 2016;5:117. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.72>.
- [33] Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science (New York, NY)* 2016;353:823–6. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF8505>.
- [34] George J, Valiant WG, Mattapallil MJ, Walker M, Huang YJS, Vanlandingham DL, et al. Prior Exposure to Zika Virus Significantly Enhances Peak Dengue-2 Viremia in Rhesus Macaques. *Scientific Reports* 2017;7. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-10901-1>.
- [35] Bardina SV, Bunduc P, Tripathi S, Duehr J, Frere JJ, Brown JA, et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. *Science* 2017;356:175–80. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAL4365>.
- [36] Halstead SB. Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. *Vaccine* 2017;35:6355–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.089>.
- [37] Maria G. Guzmán, Gustavo Kouri, Luis Valdes, Jose Bravo, Mayling Alvarez, Susana Vazques, Iselys Delgado SBH. Epidemiologic Studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *American Journal of Epidemiology* 2000;152:793–9. <https://doi.org/10.1093/aje/152.9.793>.

- [38] Chan KR, Wang X, Saron WAA, Gan ES, Tan HC, Mok DZL, et al. Cross-reactive antibodies enhance live attenuated virus infection for increased immunogenicity. *Nature Microbiology* 2016;1. <https://doi.org/10.1038/NMICROBIOL.2016.164>.
- [39] Chernokhaeva LL, Rogova YV, Vorovitch MF, Romanova LI, Kozlovskaya LI, Maikova GB, et al. Protective immunity spectrum induced by immunization with a vaccine from the TBEV strain Sofjin. *Vaccine* 2016;34:2354–61. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.041>.
- [40] Slon Campos JL, Poggianella M, Marchese S, Mossenta M, Rana J, Arnoldi F, et al. DNA-immunisation with dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. *PLoS ONE* 2017;12:e0181734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181734>.
- [41] Nygren TM, Pilic A, Böhmer MM, Wagner-Wiening C, Wichmann O, Hellenbrand W. Recovery and sequelae in 523 adults and children with tick-borne encephalitis in Germany. *Infection* 2023;51:1503–11. <https://doi.org/10.1007/s15010-023-02023-w>.
- [42] Judith H Aberle, Karin Stiasny, Michael Kundi FXH. Mechanistic insights into the impairment of memory B cells and antibody production in the elderly. *Age (Dordr)* 2012;35:371–81. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9371-9>.
- [43] Xie G, Luo H, Pang L, Peng B, Winkelmann E, McGruder B, et al. Dysregulation of Toll-Like Receptor 7 Compromises Innate and Adaptive T Cell Responses and Host Resistance to an Attenuated West Nile Virus Infection in Old Mice. *Journal of Virology* 2016;90:1333–44. <https://doi.org/10.1128/jvi.02488-15>.
- [44] Megan C Mladinich, Grace E Himmler, Jonas N Conde, Elena E Gorbunova, William R Schutt, Shayan Sarkar, Styliani-Anna E Tsirka, Hwan Keun Kim ERM. Age-dependent Powassan virus lethality is linked to glial cell activation and divergent neuroinflammatory cytokine responses in a murine model. *J Virol* 2024;98. <https://doi.org/10.1128/jvi.00560-24>.
- [45] Current ICTV Taxonomy Release n.d. <https://ictv.global/taxonomy>.
- [46] Nicholas J. Barrows, Rafael K. Campos, Kuo-Chieh Liao, K. Reddisiva Prasanth, Ruben Soto-Acosta, Shih-Chia Yeh, Geraldine Schott-Lerner, Julien Pompon, October M. Sessions, Sshelton S. Bradrick MAG-B. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem Rev* 2018;118:4448–82. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>.
- [47] Lauri I A Pulkkinen, Sarah V Barrass, Aušra Domanska, Anna K Överby, Maria Anastasina SJB. Molecular Organisation of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Viruses* 2022;14:792. <https://doi.org/10.3390/v14040792>.
- [48] Lauri I. A. Pulkkinen, Sarah J. Butcher MA. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Structural View. *Viruses* 2018;10:350. <https://doi.org/10.3390/v10070350>.
- [49] Melian EB, Hinzman E, Nagasaki T, Firth AE, Wills NM, Nouwens AS, et al. NS1' of Flaviviruses in the Japanese Encephalitis Virus Serogroup Is a Product of Ribosomal Frameshifting and Plays a Role in Viral Neuroinvasiveness. *Journal of Virology* 2010;84:1641–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.01979-09>.

- [50] Faggioni G, Pomponi A, De Santis R, Masuelli L, Ciammaruconi A, Monaco F, et al. West Nile alternative open reading frame (N-NS4B/WARF4) is produced in infected West Nile Virus (WNV) cells and induces humoral response in WNV infected individuals. *Virology Journal* 2012;9:283. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-283>.
- [51] Jarvis Z H Goh, Lachlan De Hayr, Alexander A Khromykh AS. The Flavivirus Non-Structural Protein 5 (NS5): Structure, Functions, and Targeting for Development of Vaccines and Therapeutics. *Vaccines (Basel)* 2024;12. <https://doi.org/10.3390/vaccines12080865>.
- [52] Xiaokang Zhang, Peng Ge, Xuekui Yu, Jennifer M Brannan, Guoqiang Bi, Qinfen Zhang, Stan Schein ZHZ. CryoEM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* 2012;20:105–10. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2463>.
- [53] Ishida K, Yagi H, Kato Y, Morita E. N-linked glycosylation of flavivirus E protein contributes to viral particle formation. *PLoS Pathog* 2023;19:e1011681. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011681>.
- [54] Carbaugh DL, Lazear HM. Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection and Pathogenesis. *J Virol* 2020;94:e00104-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00104-20>.
- [55] Tao Hu, Zhen Wu, Shaoxiong Wu, Shun Chen AC. The key amino acids of E protein involved in early flavivirus infection: viral entry. *Virol J* 2021;18:136. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01611-2>.
- [56] Füzik T, Formanová P, Růžek D, Yoshii K, Niedrig M, Plevka P. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nature Communications* 2018;9:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02882-0>.
- [57] Lewis JK, Bothner B, Smith TJ, Siuzdak G. Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:6774–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6774>.
- [58] Dowd KA, DeMaso CR, Pierson TC. Genotypic differences in dengue virus neutralization are explained by a single amino acid mutation that modulates virus breathing. *mBio* 2015;6. <https://doi.org/10.1128/mBio.01559-15>.
- [59] Lim XX, Chandramohan A, Lim XYE, Bag N, Sharma KK, Wirawan M, et al. Conformational changes in intact dengue virus reveal serotype-specific expansion. *Nature Communications* 2017;8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14339>.
- [60] Sotcheff S, Routh A. Understanding Flavivirus Capsid Protein Functions: The Tip of the Iceberg. *Pathogens* 2020;9:42. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010042>.
- [61] Zifang Shang, Hao Song, Yi Shi JQ, Gao GF. Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus. *J Mol Biol* 2018;430:948–62. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.02.006>.
- [62] Kaïn van den Elsen, Jun Ping Quek DL. Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. *Viruses* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/v13060956>.
- [63] Perera DR, Ranadeva ND, Sirisena K, Wijesinghe KJ. Roles of NS1 Protein in Flavivirus Pathogenesis. *ACS Infect Dis* 2024;10:20–56. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00566>.

- [64] Muller DA YPR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research* 2013;98:192–208. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>.
- [65] Carpio KL, Barrett ADT. Flavivirus NS1 and Its Potential in Vaccine Development. *Vaccines* 2021;9:622. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060622>.
- [66] Henry Puerta-Guardo, Dustin R Glasner EH. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathogens* 2016;12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005738>.
- [67] Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J* 2016;13:131. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>.
- [68] Julianna D Zeidler, Lorena O Fernandes-Siqueira, Glaucé M Barbosa ATDP. Non-Canonical Roles of Dengue Virus Non-Structural Proteins. *Viruses* 2017;9. <https://doi.org/10.3390/v9030042>.
- [69] Wahyu Surya, Shwe Sin Honey JT. Flavivirus Zika NS4A protein forms large oligomers in liposomes and in mild detergent. *Sci Rep* 2024;14. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63407-y>.
- [70] Sergey A Shiryayev, Andrei V Chernov, Alexander E Aleshin, Tatiana N Shiryayeva AYS. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *J Gen Virol* 2009;90:2081–5. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012864-0>.
- [71] Qiming Liang, Zhifei Luo, Jianxiong Zeng, Weiqiang Chen, Suan-Sin Foo, Shin-Ae Lee, Jianning Ge, Su Wang, Steven A Goldman, Berislav V Zlokovic, Zhen Zhao JUJ. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Dereulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* 2016;19:663–71. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.019>.
- [72] Yoshii K. Epidemiology and pathological mechanisms of tick-borne encephalitis. *J Vet Med Sci* 2019;81:343–7. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0373>.
- [73] Kroschewski H, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 2003;308:92–100.
- [74] Kozlovskaya LI, Osolodkin DI, Shevtsova AS, Romanova LIu, Rogova YV, Dzhivanian TI, et al. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 2010;398:262–72. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.12.012>.
- [75] Anwar MN, Akhtar R, Abid M, Khan SA, Rehman ZU, Tayyub M, et al. The interactions of flaviviruses with cellular receptors: Implications for virus entry. *Virology* 2022;568:77–85. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2022.02.001>.
- [76] Boris N Zaitsev, Fabrizio Benedetti, Andrey G Mikhaylov, Denis V Korneev, Sergey K Sekatskii, Tanya Karakouz, Pavel A Belavin, Nina A Netesova, Elena V Protopopova, Svetlana N Konovalova, Giovanni Dietler VBL. Force-induced globule-coil transition in laminin binding protein and its role for viral-cell membrane fusion. *J Mol Recognit* 2014;27:727–38. <https://doi.org/10.1002/jmr.2399>.

- [77] Malygin A.A., Bondarenko E.I., Ivanisenko V.A., Protopopova E. V., Karpova G.G. LVB. C-terminal fragment of human laminin-binding protein contains a receptor domain for venezuelan equine encephalitis and tick-borne encephalitis viruses. *Biochemistry (Mosc)* 2009;74:1326–36. <https://doi.org/10.1134/s0006297909120050>.
- [78] Mittler E, Tse AL, Tran P-T-H, Florez C, Janer J, Varnaite R, et al. LRP8 is a receptor for tick-borne encephalitis virus. *Nature* 2025;646:945–52. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09500-2>.
- [79] Van Der Schaar HM, Rust MJ, Chen, Van Der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathogens* 2008;4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000244>.
- [80] Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MARB, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews* 2015;39:155–70. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>.
- [81] Yu C, Achazi K, Möller L, Schulzke JD, Niedrig M, Bückner R. Tick-Borne Encephalitis Virus Replication, Intracellular Trafficking, and Pathogenicity in Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *PLoS ONE* 2014;9:e96957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096957>.
- [82] Haslwanter D, Blaas D, Heinz FX, Stiasny K. A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection. *PLoS Pathogens* 2017;13:1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006643>.
- [83] Richard Fritz, Karin Stiasny FXH. Identification of specific histidines as pH sensors in flavivirus membrane fusion. *J Cell Biol* 2008;183:353–61. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806081>.
- [84] Stéphane Bressanelli, Karin Stiasny, Steven L Allison, Enrico A Stura, Stéphane Duquerroy, Julien Lescar, Franz X Heinz FAR. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J* 2004;23:728–38. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600064>.
- [85] Laura A. Byk, Néstor G. Iglesias, Federico A. De Maio, Leopoldo G. Gebhard, Mario Rossi AVG. Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination. *mBio* 2016;7:804–6. <https://doi.org/10.1128/mBio.00804-16>.
- [86] Edgil D, Polacek C, Harris E. Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. *Journal of Virology* 2006;80:2976–86. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.6.2976-2986.2006>.
- [87] Chiu W-W, Kinney RM, Dreher TW. Control of Translation by the 5'- and 3'-Terminal Regions of the Dengue Virus Genome. *Journal of Virology* 2005;79:8303–15. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.13.8303-8315.2005>.
- [88] John W.B. Hershey, Nahum Sonenberg MBM. Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011528>.

- [89] Dever TE, Green R. The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2012;4:1–16. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A013706>.
- [90] Fritz R, Blazevic J, Taucher C, Pangerl K, Heinz FX, Stiasny K. The Unique Transmembrane Hairpin of Flavivirus Fusion Protein E Is Essential for Membrane Fusion. *Journal of Virology* 2011;85:4377–85. <https://doi.org/10.1128/jvi.02458-10>.
- [91] Blazevic J, Rouha H, Bradt V, Heinz FX, Stiasny K. Membrane Anchors of the Structural Flavivirus Proteins and Their Role in Virus Assembly. *Journal of Virology* 2016;90:6365–78. <https://doi.org/10.1128/jvi.00447-16>.
- [92] Roby JA, Setoh YX, Hall RA, Khromykh AA. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *Journal of General Virology* 2015;96:1551–69. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000097>.
- [93] Caroline Thurner, Christina Witwer, Ivo L. Hofacker PFS. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J Gen Virol* 2004;85. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19462-0>.
- [94] YanPing Duan, Miao Zeng, Bowen Jiang, Wei Zhang, Mingshu Wang RJ, Dekang Zhu, Mafeng Liu, Xinxin Zhao, Qiao Yang YW, ShaQiu Zhang, YunYa Liu, Ling Zhang, YanLing Yu, Leichang Pan, Shun Chen AC. Flavivirus RNA-Dependent RNA Polymerase Interacts with Genome UTRs and Viral Proteins to Facilitate Flavivirus RNA Replication. *Viruses* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/v11100929>.
- [95] Sergio M. Villordo and Andrea V. Gamarnik. Genome Cyclization as Strategy for Flavivirus RNA Replication. *Virus Res* 2009;139:230–9. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.016>.
- [96] Oliveira ERA, Mohana-Borges R, de Alencastro RB, Horta BAC. The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Research* 2017;227:115–23. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.005>.
- [97] Jae Hyoung Im, Ji-Hyeon Baek, Areum Durey, Hea Yoon Kwon, Moon-Hyun Chung J-SL. Geographic distribution of Tick-borne encephalitis virus complex. *J Vector Borne Dis* 2020;57(1). <https://doi.org/10.4103/0972-9062.308794>.
- [98] Chernokhaeva LL, Kholodilov IS, Pakskina ND. Current Distribution Area of Tick-Borne Encephalitis in the Russian Federation. *Medical Virology* 2016;30. https://doi.org/10.15610/30_1_1.
- [99] 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. *Emerging Microbes and Infections* 2018;7. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0081-6>.
- [100] Valeryevna KI, Vasilievna DT, Evgenyevich TS, Konstantinovna DE, Vasilievna LO, Mihailovna VM, et al. Characteristics of the baikal subtype of tick-borne encephalitis virus circulating in eastern siberia. *Acta Biomedica Scientifica* 2018;3:53–60. <https://doi.org/10.29413/ABS.2018-3.4.9>.

- [101] Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology* 1999;80:179–85. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-1-179>.
- [102] Bogovic P, Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World Journal of Clinical Cases* 2015;3:430. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i5.430>.
- [103] Рудаков НВ, Ястребов ВК, Якименко ВВ. Эпидемиология Омской Геморрагической Лихорадки. *Эпидемиология И Вакцинопрофилактика* 2015;80:39–48.
- [104] Růžek D, Yakimenko VV, Karan LS, Tkachev SE. Omsk haemorrhagic fever. *The Lancet* 2010;376:2104–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61120-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61120-8).
- [105] Kovalev, S.Y., Mazurina E.A., Yakimenko V.V. Molecular variability and genetic structure of Omsk hemorrhagic fever virus, based on analysis of the complete genome sequences. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 2021;12. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101627>.
- [106] Holbrook MR, Aronson JF, Campbell GA, Jones S, Feldmann H, Barrett ADT. An Animal Model for the Tickborne Flavivirus-Omsk Hemorrhagic Fever Virus. 2005.
- [107] Ae GNL, Kondratov IG, Ae VAT, Ae EVR, Ae EVP, Chausov E V, et al. Characterization of Powassan viruses from Far Eastern Russia 2009. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0376-y>.
- [108] Kendra N Pesko, Fernando Torres-Perez , Brian L Hjelle GDE. Molecular epidemiology of Powassan virus in North America. *J Gen Virol* 2010;91:2698–705. <https://doi.org/10.1099/vir.0.024232-0>.
- [109] Kuno G, Artsob H, Karabatsos N, Tsuchiya KR, Chang G. Genomic sequencing of deer tick virus and phylogeny of powassan-related viruses of North America. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:671–6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.671>.
- [110] Anne Piantadosi IHS. Powassan virus encephalitis. *Infect Dis Clin North Am* 2023;36:671–88. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2022.03.003>.
- [111] D Nash, F Mostashari, A Fine, J Miller, D O’Leary, K Murray, A Huang, A Rosenberg, A Greenberg, M Sherman, S Wong ML. THE OUTBREAK OF WEST NILE VIRUS INFECTION IN THE NEW YORK CITY AREA IN 1999 A BSTRACT. *N Engl J Med* 2001;344.
- [112] Rossi SL, Scholar P, Ross TM, Member D, Evans JD. West Nile Virus Corresponding author for proof and reprints. *Clin Lab Med* 2010;30:47–65. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.006>.
- [113] Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West nile virus. *Clinics in Laboratory Medicine* 2010;30:47–65. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.006>.
- [114] Klingelhöfer D, Braun M, Kramer IM, Reuss F, Müller R, Groneberg DA, et al. A virus becomes a global concern: research activities on West-Nile virus. *Emerg Microbes Infect* 2023;12(2). <https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2256424>.
- [115] Zerbato V, Rossi B, Di Bella S, Bartalucci C, Cerchiaro M, Da Re D, et al. West Nile virus: epidemiology, prevention, clinical features, diagnosis, treatment, and open research

questions. *Annals of Medicine* 2026;58:2615482. <https://doi.org/10.1080/07853890.2026.2615482>.

- [116] Козлова Алина Александровна. Изучение ареала вируса Западного Нила в Европейской части России. 2020.
- [117] Климова Е.А., Кареткина Г.Н., Шакарян А.К., Сайфуллин М.А., Карань Л.С., Ларичев В.Ф. ГЯЕ, Морозкин Е.С., Ляпейкова Е.А., Абрамова Е.Н., Гусева Г.Д., Посуховский Е.А., Ильина М.А., Смирнова Т.Ю., Ченцов В.Б., Цветкова Н.А., Антипят Н.А., Базарова М.В., Краснова С.В., Сметанина С.В. ЮНД. Лихорадка Западного Нила на территории Московской агломерации. *Инфекционные Болезни: Новости, Мнения, Обучение* 2021;10:13–21. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-4-13-21>.
- [118] Federica Frasca, Leonardo Sorrentino, Matteo Fracella, Alessandra D’Auria, Eleonora Coratti, Luca Maddaloni, Ginevra Bugani, Massimo Gentile, Alessandra Pierangeli, Gabriella d’Ettore CS. An Update on the Entomology, Virology, Pathogenesis, and Epidemiology Status of West Nile and Dengue Viruses in Europe (2018–2023). *Trop Med Infect Dis* 2024;9. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9070166>.
- [119] A.V. Toporkov, E.V. Putintseva SKU. West Nile fever as a relevant health hazard: The history of studying measures of and its prevention in Russia. *Journal Health Risk Analysis* 2023;3:138–49. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2023.3.13.eng>.
- [120] Gervais Habarugira, Willy W Suen, Jody Hobson-Peters, Roy A Hall HB-O. West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and “One Health” Implications. *Pathogens* 2020;9:589. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070589>.
- [121] Kaiser R. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98. A prospective study of 656 patients. *Brain* 1999;122:2067–78. <https://doi.org/10.1093/brain/122.11.2067>.
- [122] Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *The Lancet* 2008;371:1861–71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60800-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60800-4).
- [123] Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *The Lancet* 2008;371:1861–71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60800-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60800-4).
- [124] Hermance ME, Thangamani S. Powassan Virus: An Emerging Arbovirus of Public Health Concern in North America. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 2017;17:453–62. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2110>.
- [125] Khan M, Beckham JD, Piquet AL, Tyler KL, Pastula DM. An Overview of Powassan Virus Disease n.d. <https://doi.org/10.1177/1941874419844888>.
- [126] Lindqvist R, Upadhyay A, Överby AK. Tick-Borne Flaviviruses and the Type I Interferon Response n.d. <https://doi.org/10.3390/v10070340>.
- [127] Campbell DGL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *The Lancet* 2002;2:519–29. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00368-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00368-7).
- [128] Sejvar J. Clinical Manifestations and Outcomes of West Nile Virus Infection. *Viruses* 2014;6:606–23. <https://doi.org/10.3390/v6020606>.

- [129] А. Л. Берковский, Е. В. Сергеева, А. В. Суворов ААКозлов. Внешний путь свёртывания крови. Методы исследования. Москва: 2019.
- [130] Eisenreich A, Rauch U. Regulation and Differential Role of the Tissue Factor Isoforms in Cardiovascular Biology. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2010;20:199–203. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2011.08.001>.
- [131] Marco Witkowski 1, Ulf Landmesser 1 UR 2. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med* 2016;26:297–303. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.12.001>.
- [132] Nigel Mackman, Rachel E. Tilley NSK. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1687–93. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.141911>.
- [133] Tiruneh Adane SG. Coagulation abnormalities in Dengue fever infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2021;15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009666>.
- [134] Ampaiwan Chuansumrita WC. Hemostatic derangement in dengue hemorrhagic fever. *THROMBOSIS RESEARCH* 2014;133:10–6. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.09.028>.
- [135] А. Н. Васильев, В. В. Малиновская, В. В. Парфенов. Интерфероны первого типа - индукция и механизмы противовирусного действия. *Антибиотики и химиотерапия* 2009;54:50.
- [136] Kenya Honda TT. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2006;6:644–58. <https://doi.org/10.1038/nri1900>.
- [137] William M. Schneider, Meike Dittmann Chevillotte CMR. Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology* 2014;44:735–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>.
- [138] Best SM, Morris KL, Shannon JG, Robertson SJ, Mitzel DN, Park GS, et al. Inhibition of Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling by a Tick-Borne Flavivirus and Identification of NS5 as an Interferon Antagonist. *Journal of Virology* 2005;79:12828–39. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.20.12828-12839.2005>.
- [139] Lubick KJ, Robertson SJ, McNally KL, Freedman BA, Angela L, Taylor RT, et al. Flavivirus antagonism of type I interferon signaling reveals prolidase as a regulator of IFNAR1 surface expression 2015;18:61–74. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.06.007>.
- [140] R Travis Taylor, Kirk J Lubick, Shelly J Robertson, James P Broughton, Marshall E Bloom, Wade A Bresnahan SMB. TRIM79 α , an interferon-stimulated gene product, restricts tick-borne encephalitis virus replication by degrading the viral RNA polymerase. *Cell Host Microbe* 2012;10:185–96. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.004>.
- [141] Vonderstein K, Nilsson E, Hubel P, Nygård Skalman L, Upadhyay A, Pasto J, et al. Viperin Targets Flavivirus Virulence by Inducing Assembly of Noninfectious Capsid Particles. *J Virol* 2018;92:e01751-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01751-17>.

- [142] Monika Gudowska-Sawczuk BM. Selected Biomarkers of Tick-Borne Encephalitis: A Review. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms221910615>.
- [143] Grygorczuk S, Czupryna P, Pancewicz S, Świerzbńska R, Dunaj J, Siemieniako A, et al. The increased intrathecal expression of the monocyte-attracting chemokines CCL7 and CXCL12 in tick-borne encephalitis. *Journal of NeuroVirology* 2021;27:452–62. <https://doi.org/10.1007/S13365-021-00975-Z/METRICS>.
- [144] Pokorna Formanova P, Palus M, Salat J, Hönig V, Stefanik M, Svoboda P, et al. Changes in Cytokine and Chemokine Profiles in Mouse Serum and Brain, and in Human Neural Cells, upon Tick-Borne Encephalitis Virus Infection. *J Neuroinflammation* 2019;16. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1596-z>.
- [145] Bogovič P, Kastrin A, Lotrič-Furlan S, Ogrinc K, Avšič Županc T, Korva M, et al. Comparison of laboratory and immune characteristics of the initial and second phase of tick-borne encephalitis. *Emerging Microbes & Infections* 2022;11:1647. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2086070>.
- [146] Mya Myat Ngwe Tun, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Corazon C Buerano, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita DH. Protective role of TNF- α , IL-10 and IL-2 in mice infected with the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus. *Sci Rep* 2014;4. <https://doi.org/10.1038/srep05344>.
- [147] Tigabu B, Juelich T, Holbrook MR. Comparative analysis of immune responses to Russian spring-summer encephalitis and Omsk hemorrhagic fever viruses in mouse models 2010. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.021>.
- [148] Reynolds ES, Hart CE, Nelson JT, Marzullo BJ, Esterly AT, Paine DN, et al. Comparative Pathogenesis of Two Lineages of Powassan Virus Reveals Distinct Clinical Outcome, Neuropathology, and Inflammation. *Viruses* 2024;16:820. <https://doi.org/10.3390/v16060820>.
- [149] Fares-Gusmao R, Coelho Rocha B, Sippert E, Lanteri MC, Áñez G, Rios M. Differential Pattern of Soluble Immune Markers in Asymptomatic Dengue, West Nile and Zika Virus Infections. *Scientific Reports* 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53645-w>.
- [150] Constant O, Barthelemy J, Nagy A, Salinas S, Simonin Y. West Nile Virus Neuroinfection in Humans: Peripheral Biomarkers of Neuroinflammation and Neuronal Damage. *Viruses* 2022;14:756. <https://doi.org/10.3390/v14040756>.
- [151] Zidovec-Lepej S, Vilibic-Cavlek T, Barbic L, Ilic M, Savic V, Tabain I, et al. Antiviral Cytokine Response in Neuroinvasive and Non-Neuroinvasive West Nile Virus Infection. *Viruses* 2021;13:342. <https://doi.org/10.3390/v13020342>.
- [152] Susana V Bardina, Daniela Michlmayr, Kevin W Hoffman, Christopher J Obara, Janet Sum, Israel F Charo, Wuyuan Lu, Alexander G Pletnev JKL. Differential Roles of Chemokines CCL2 and CCL7 in Monocytosis and Leukocyte Migration during West Nile Virus Infection. *J Immunol* 2015;195:4306–18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500352>.
- [153] Fares-Gusmao R, Rocha BC, Sippert E, Lanteri MC, Áñez G, Rios M. Differential Pattern of Soluble Immune Markers in Asymptomatic Dengue, West Nile and Zika Virus Infections. *Sci Rep* 2019;9:17172. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53645-w>.

- [154] Blom K, Cuapio A, Sandberg JT, Varnaite R, Michaëlsson J, Björkström NK, et al. Cell-Mediated Immune Responses and Immunopathogenesis of Human Tick-Borne Encephalitis Virus-Infection. *Frontiers in Immunology* 2018;9:2174. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02174>.
- [155] Tomažič J, Ihan A. Flow cytometric analysis of lymphocytes in cerebrospinal fluid in patients with tick-borne encephalitis. *Acta Neurologica Scandinavica* 1997;95:29–33. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0404.1997.TB00064.X>.
- [156] Blom K, Braun M, Pakalniene J, Lunemann S, Enqvist M, Dailidyte L, et al. NK Cell Responses to Human Tick-Borne Encephalitis Virus Infection. *The Journal of Immunology* 2016;197:2762–71. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1600950>.
- [157] Yao Y, Strauss-Albee DM, Zhou JQ, Malawista A, Garcia MN, Murray KO, et al. The natural killer cell response to West Nile virus in young and old individuals with or without a prior history of infection. *PLoS ONE* 2017;12:e0172625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172625>.
- [158] Zhang M, Daniel S, Huang Y, Chancey C, Huang Q, Lei YF, et al. Anti-West Nile virus activity of in vitro expanded human primary natural killer cells. *BMC Immunology* 2010;11:3. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-3>.
- [159] Oliphant T, Nybakken GE, Engle M, Xu Q, Nelson CA, Sukupolvi-Petty S, et al. Antibody Recognition and Neutralization Determinants on Domains I and II of West Nile Virus Envelope Protein. *Journal of Virology* 2006;80:12149. <https://doi.org/10.1128/JVI.01732-06>.
- [160] Lai C-Y, Tsai W-Y, Lin S-R, Kao C-L, Hu H-P, King C-C, et al. Antibodies to Envelope Glycoprotein of Dengue Virus during the Natural Course of Infection Are Predominantly Cross-Reactive and Recognize Epitopes Containing Highly Conserved Residues at the Fusion Loop of Domain II. *Journal of Virology* 2008;82:6631. <https://doi.org/10.1128/JVI.00316-08>.
- [161] Jarmer J, Zlatkovic J, Tsouchnikas G, Vratskikh O, Strauß J, Aberle JH, et al. Variation of the Specificity of the Human Antibody Responses after Tick-Borne Encephalitis Virus Infection and Vaccination 2014. <https://doi.org/10.1128/JVI.02086-14>.
- [162] Mickaël V Cherrier, Bärbel Kaufmann, Grant E Nybakken, Shee-Mei Lok, Julia T Warren, Beverly R Chen, Christopher A Nelson, Victor A Kostyuchenko, Heather A Holdaway, Paul R Chipman, Richard J Kuhn, Michael S Diamond, Michael G Rossmann DHF. Structural basis for the preferential recognition of immature flaviviruses by a fusion-loop antibody. *EMBO Journal* 2009;28:3269–76. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.245>.
- [163] Chambers TJ, Diamond MS. Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Advances in Virus Research* 2003;60:273–342. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)60008-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)60008-4).
- [164] Sanchez-Vargas LA, Mathew A, Salje H, Sousa D, Casale NA, Farmer A, et al. Protective Role of NS1-Specific Antibodies in the Immune Response to Dengue Virus Through Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *The Journal of Infectious Diseases* 2024;230:1147–56. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiae137>.

- [165] Kaech SM, Ahmed R. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nature Immunology* 2001;2:415. <https://doi.org/10.1038/87720>.
- [166] Blom K, Braun M, Pakalniene J, Dailidyte L, Béziat V, Lampen MH, et al. Specificity and Dynamics of Effector and Memory CD8⁺ T Cell Responses in Human Tick-Borne Encephalitis Virus Infection. *PLoS Pathogens* 2015;11:1–20. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004622>.
- [167] Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H, et al. The Yellow Fever Virus Vaccine Induces a Broad and Polyfunctional Human Memory CD8⁺ T Cell Response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2009;183:7919. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0803903>.
- [168] Růžek D, Salát J, Palus M, Gritsun TS, Gould EA, Dyková I, et al. CD8⁺ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* 2009;384:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.023>.
- [169] Netland J, Bevan M. CD8 and CD4 T Cells in West Nile Virus Immunity and Pathogenesis. *Viruses* 2013;5:2573–84. <https://doi.org/10.3390/v5102573>.
- [170] Nelson J, Ochoa L, Villareal P, Dunn T, Wu P, Vargas G, et al. Powassan Virus Induces Structural Changes in Human Neuronal Cells In Vitro and Murine Neurons In Vivo. *Pathogens* 2022;11:1218. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101218>.
- [171] Aberle JH, Schwaiger J, Aberle SW, Stiasny K, Scheinost O, Kundi M, et al. Human CD4⁺ T Helper Cell Responses after Tick-Borne Encephalitis Vaccination and Infection. *PLoS ONE* 2015;10. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0140545>.
- [172] Tuchynskaya K, Volok V, Illarionova V, Okhezin E, Polienko A, Belova O, et al. Experimental assessment of possible factors associated with tick-borne encephalitis vaccine failure. *Microorganisms* 2021;9. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9061172/S1>.
- [173] Chernokhaeva LL, Rogova YV, Kozlovskaya LI, Romanova LI, Osolodkin DI, Vorovitch MF, et al. Experimental Evaluation of the Protective Efficacy of Tick-Borne Encephalitis (TBE) Vaccines Based on European and Far-Eastern TBEV Strains in Mice and in Vitro. *Front Microbiol* 2018;9:1487. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01487>.
- [174] Maximova OA, Faucette LJ, Ward JM, Murphy BR, Pletnev AG. Cellular Inflammatory Response to Flaviviruses in the Central Nervous System of a Primate Host. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2009;57:973–89. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954180>.
- [175] V. V. Pogodina; M.P. Frolova; G.V. Malenko; G.I. Fokina; L.S. Levina; L.L. Mamonenko; G.V. Koreshkova; N.M. Ralf. Персистенция вируса клещевого энцефалита у заражённых обезьян. *Acta Virol* 1981;25:337–43.
- [176] Pripuzova NS, Tereshkina NV, Gmyl LV, Dzhivanyan TI, Rumyantsev AA, Romanova LI, et al. Safety Evaluation of Chimeric Langat/Dengue 4 Flavivirus, a Live Vaccine Candidate Against Tick-Borne Encephalitis. *J Med Virol* 2009;81:1777–85. <https://doi.org/10.1002/jmv.21587>.

- [177] Corrin T, Greig J, Harding S, Young I, Mascarenhas M, Waddell LA. Powassan virus, a scoping review of the global evidence. *Zoonoses Public Health* 2018. <https://doi.org/10.1111/zph.12485>.
- [178] Frolova MP, Isachkova LM, Shestopalova NM, Pogodina VV. Experimental encephalitis in monkeys caused by the Powassan virus. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 1985;15:62–9. <https://doi.org/10.1007/BF01186452>.
- [179] Verstrepen BE, Fagrouch Z, Van Heteren M, Buitendijk H, Haaksma T, Beenhakker N, et al. Experimental Infection of Rhesus Macaques and Common Marmosets with a European Strain of West Nile Virus. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:e2797. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002797>.
- [180] Pogodina VV, Frolova MP, Malenko GV, Fokina GI, Koreshkova GV, Kiseleva LL, et al. Study on West Nile virus persistence in monkeys. *Archives of Virology* 1983;75:71–86. <https://doi.org/10.1007/BF01314128>.
- [181] Division US. Yellow Fever Vaccine: Current Outlook n.d.
- [182] Max Theiler HHS. THE USE OF YELLOW FEVER VIRUS MODIFIED BY IN VITRO CULTIVATION FOR HUMAN IMMUNIZATION. *J Exp Med* 1937;65:787–800. <https://doi.org/10.1084/jem.65.6.787>.
- [183] Sang-Im Yun Y-ML. Japanese encephalitis. *Hum Vaccin Immunother* 2013;10:263–79. <https://doi.org/10.4161/hv.26902>.
- [184] Sudip Kumar Dutta TL. A Perspective on Current Flavivirus Vaccine Development: A Brief Review. *Viruses* 2023;15. <https://doi.org/10.3390/v15040860>.
- [185] Jorge E Osorio, Claire Y-H Huang, Richard M Kinney DTS. Development of DENVax: A chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. *Vaccine* 2011;29:7251–60. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.020>.
- [186] Vianney Tricou, Delia Yu, Humberto Reynales, Shibadas Biswal, Prof Xavier Saez-Llorens, Chukiat Sirivichayakul, Pio Lopez, Charissa Borja-Tabora, Lulu Bravo, Prof Pope Kosalaraksa, Luis Martinez Vargas, Maria Theresa Alera, Luis Rivera, Prof Veerachai Wat DW. Long-term efficacy and safety of a tetravalent dengue vaccine (TAK-003): 4-5-year results from a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* 2024;12:e257–70. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(23\)00522-3](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00522-3).
- [187] New vaccine to protect people in the EU and worldwide against dengue 2022.
- [188] Nicole Berens-Riha, Petra Andries, Annelies Aerssens, Quentin Ledure, Yolien Van Der Beken, Leo Heyndrickx, Els Genbrugge, Achilleas Tsoumanis, Yven Van Herrewwege, Kevin K Ariën, Martine Van Innis, Peter Vanbrabant PS. Five accelerated schedules for the tick-borne encephalitis vaccine FSME-Immun® in last-minute travellers: an open-label, single-centre, randomized controlled pilot trial. *J Travel Med* 2023;31. <https://doi.org/10.1093/jtm/taad053>.
- [189] Kentaro Yoshii, Joon Young Song, Seong-Beom Park, Junfeng Yang H-JS. Tick-borne encephalitis in Japan, Republic of Korea and China. *Emerg Microbes Infect* 2017;6. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.69>.

- [190] Andersson CR, Vene S, Insulander M, Lindquist L, Lundkvist Å, Günther G. Vaccine failures after active immunisation against tick-borne encephalitis. *Vaccine* 2010;28:2827–31. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2010.02.001>.
- [191] Hansson KE, Rosdahl A, Insulander M, Vene S, Lindquist L, Gredmark-Russ S, et al. Tick-borne encephalitis vaccine failures: A 10-year retrospective study supporting the rationale for adding an extra priming dose in individuals starting at age 50 years. *Clinical Infectious Diseases* 2019;70:245–51. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz176>.
- [192] S Lotrič-Furlan, P Bogovič, T Avšič-Županc, M Jelovšek, L Lusa FS. Tick-borne encephalitis in patients vaccinated against this disease. *J Intern Med* 2017;282:142–55. <https://doi.org/10.1111/joim.12625>.
- [193] Pogodina, V.V.; Luchinina, S.V.; Stepanova, O.N.; Stenko, E.A.; Gorfinkel, A.N.; Karmysheva, V.Y.; Gerasimov, S.G.; Levina, L.S.; Chirkova, G.G.; Karan LS; et al. Unusual case of lethal tick-borne encephalitis in patient vaccinated with vaccines produced from different viruses strains (the Chelyabinsk Region). *Epidemiol Infekc Bolezn* 2015;20:56–64. <https://doi.org/10.17816/EID40869>.
- [194] Francis T. On the doctrine of original antigenic sin. *Proceedings of the American Philosophical Society* 1960;104:572–8.
- [195] F M DAVENPORT, A V HENNESSY TFJ. Epidemiologic and immunologic significance of age distribution of antibody to antigenic variants of influenza virus. *J Exp Med* 1953;98:641–56. <https://doi.org/10.1084/jem.98.6.641>.
- [196] Ali Zhang, Hannah D. Stacey, Caitlin E. Mullarkey MSM. Original Antigenic Sin: How First Exposure Shapes Lifelong Anti-Influenza Virus Immune Responses. *The Journal of Immunology* 2019;202:335–40. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801149>.
- [197] Mariam Maltseva, Alexa Keeshan, Curtis Cooper M-AL. Immune imprinting: The persisting influence of the first antigenic encounter with rapidly evolving viruses. *Hum Vaccin Immunother* 2024;20. <https://doi.org/10.1080/21645515.2024.2384192>.
- [198] Victoria Bradt, Stefan Malafa, Amrei von Braun, Johanna Jarmer, Georgios Tsouchnikas, Iris Medits, Kerstin Wanke, Urs Karrer, Karin Stiasny FXH. Pre-existing yellow fever immunity impairs and modulates the antibody response to tick-borne encephalitis vaccination. *NPJ Vaccines* 2019;4. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0133-5>.
- [199] Antonio Santos-Peral, Fabian Lupp, Sebastian Goresch, Elena Nikolova, Magdalena Zaucha, Lisa Lehmann, Frank Dahlstroem, Hadi Karimzadeh, Julia Thorn-Seshold, Elena Winheim, Ev-Marie Schuster, Gerhard Dobler, Michael Hoelscher, Beate M Kümmerer, Stefan En SR. Prior flavivirus immunity skews the yellow fever vaccine response to cross-reactive antibodies with potential to enhance dengue virus infection. *Nat Commun* 2024;15. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45806-x>.
- [200] Illarionova V, Rogova A, Tuchynskaya K, Volok V, Rogova Y, Baryshnikova V, et al. Inapparent Tick-Borne Orthoflavivirus Infection in *Macaca fascicularis*: A Model for Antiviral Drug and Vaccine Research. *Vaccines* 2023, Vol 11, Page 1754 2023;11:1754. <https://doi.org/10.3390/VACCINES11121754>.

- [201] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* 1938;27:493–7. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A118408/2/27-3-493.PDF.GIF>.
- [202] Fedina MP, Ivannikov RI, Karganova GG, Litov AG. Test systems for the laboratory detection and differentiation of Powassan virus from tick-borne encephalitis virus (Flaviviridae: Orthoflavivirus) using RT-PCR and RT-qPCR. *Problems of Virology* 2026;71:162–74. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-364>.
- [203] Gmyl AP, Korshenko SA, Belousov EV, Khitrina EV, Agol VI. Nonreplicative homologous RNA recombination: Promiscuous joining of RNA pieces? *RNA* 2003;9:1221–31. <https://doi.org/10.1261/rna.5111803>.
- [204] Lorenz R, Bögel K. Laboratory techniques in rabies: methods of calculation. Monograph Series World Health Organization 1973;23:321–35.
- [205] Victoria Baryshnikova, Yuriy Turchenko, Ksenia Tuchynskaya, Ilmira Belyaletdinova, Alexander Butenko, Alena Dereventsova, Georgy Ignatiev, Ivan Kholodilov, Victor Larichev, Ekaterina Lyapeykova, Anastasiya Rogova, Armen Shakaryan, Anna Shishova, Anatoly G GK. Recombinant TBEV Protein E of the Siberian Subtype Is a Candidate Antigen in the ELISA Test System for Differential Diagnosis. *Diagnostics (Basel)* 2023;13:3277. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13203277>.
- [206] T P Monath, C B Cropp, G S Bowen, G E Kemp, C J Mitchell JJG. Variation in Virulence for Mice and Rhesus Monkeys Among St. Louis Encephalitis Virus Strains of Different Origin. *Am J Trop Med Hyg* 1980;29:948–62. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.948>.
- [207] Sergei I. Belikov , Ilya G. Kondratov, Ulyana V. Potapova GNL. The Relationship between the Structure of the Tick-Borne Encephalitis Virus Strains and Their Pathogenic Properties. *PLoS ONE* 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094946>.
- [208] Yoshii Kentaro, Shoko Yamazaki, Keita Mottate, Noriyo Nagata, Takahiro Seto, Takashiro Sanada, Mizuki Sakai, Hiroaki Kariwa IT. Genetic and Biological Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus Isolated from Wild Rodents in Southern Hokkaido, Japan in 2008. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2013;13. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1231>.
- [209] Emilie Donadieu, Céline Bahuon, Steeve Lowenski, Stéphan Zientara, Muriel Couplier SL. Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses. *Viruses* 2013;5:2856–80. <https://doi.org/10.3390/v5112856>.
- [210] A, Daisuke Hayasaka, Noriyo Nagata, Yoshiki Fujii, Hideki Hasegawa, Tetsutaro Sata, Ryuji Suzuki, Ernest A. Gould, Ikuo Takashima SK. Mortality following peripheral infection with Tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. *Virology* 2009;390:139–50. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.04.026>.
- [211] Daisuke Hayasaka, Noriyo Nagata, Hideki Hasegawa, Tetsutaro Sata, Ikuo Takashima SK. Early Mortality Following Intracerebral Infection with the Oshima Strain of Tick- Borne Encephalitis Virus in a Mouse Model. *J Vet Med Sci* 2010;72:391–6. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0258>.

- [212] Emily McDonald, Sarabeth Mathis, Stacey W Martin, J Erin Staples, Marc Fischer NPL. Surveillance for West Nile virus disease - United States, 2009-2018. *Am J Transplant* 2021;21:1959–74. <https://doi.org/10.1111/ajt.16595>.
- [213] Flurkey K, Mcurrer J, Harrison D. Mouse Models in Aging Research. *The Mouse in Biomedical Research*, vol. III, Elsevier; 2007, p. 637–72. <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50074-1>.
- [214] Renato AS Oliveira, Edmilson F de Oliveira-Filho, Ana IV Fernandes, Carlos AA Brito, Ernesto TA Marques, Marli C Tenório LHG. Previous dengue or Zika virus exposure can drive to infection enhancement or neutralisation of other flaviviruses. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2019;114. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190098>.
- [215] Jose L Slon Campos 1, Monica Poggianella, Sara Marchese, Monica Mossenta, Jyoti Rana, Francesca Arnoldi, Marco Bestagno ORB. DNA-immunisation with dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. *PLoS ONE* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181734>.
- [216] Myat M, Tun N, Aoki K, Senba M, Buerano CC, Shirai K, et al. Protective role of TNF- α , IL-10 and IL-2 in mice infected with the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus. *Scientific Reports* 2014;4. <https://doi.org/10.1038/srep05344>.
- [217] Danielli M, Thomas RC, Quinn LM, Tan BK. Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in vascular inflammatory diseases. *Vasa* 2022;51:341–50. <https://doi.org/10.1024/0301-1526/A001031>.
- [218] Hui Li, Shiyu Du, Panpan Niu, Xiaosong Gu, Jun Wang YZ. Vascular Adhesion Protein-1 (VAP-1)/Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase (SSAO): A Potential Therapeutic Target for Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Front Pharmacol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.679707>.
- [219] Salmi M, Jalkanen S. Vascular Adhesion Protein-1: A Cell Surface Amine Oxidase in Translation. *Antioxidants & Redox Signaling* 2019;30:314–32. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7418>.
- [220] Arghavan Jahandideh, Jenni Virta, Xiang-Guo Li, Heidi Liljenbäck, Olli Moisio, Jesse Ponkamo, Noora Rajala, Marion Alix, Jukka Lehtonen, Mikko I Mäyränpää, Tiina A Salminen, Juhani Knuuti, Sirpa Jalkanen, Antti Saraste AR. Vascular adhesion protein-1-targeted PET imaging in autoimmune myocarditis. *J Nucl Cardiol* 2023;30:2760–72. <https://doi.org/10.1007/s12350-023-03371-8>.
- [221] Nicholas E Propson, Ethan R Roy, Alexandra Litvinchuk, Jörg Köhl HZ. Endothelial C3a receptor mediates vascular inflammation and blood-brain barrier permeability during aging. *J Clin Invest* 2021;131. <https://doi.org/10.1172/JCI140966>.
- [222] Hannah Nora Wolf, Larissa Guempelein, Juliane Schikora DP. C3a Mediates Endothelial Barrier Disruption in Brain-Derived, but Not Retinal, Human Endothelial Cells. *Int J Mol Sci* 2024;25. <https://doi.org/10.3390/ijms252011240>.
- [223] Sambor Grygorczuk, Piotr Czupryna, Sławomir Pancewicz, Renata Świerzbńska, Justyna Dunaj, Agnieszka Siemieniako AM-M. The increased intrathecal expression of the monocyte-attracting chemokines CCL7 and CXCL12 in tick-borne encephalitis. *J Neurovirol* 2021;27:452–62. <https://doi.org/10.1007/s13365-021-00975-z>.

- [224] Bogovič P, Lusa L, Korva M, Lotrič-Furlan S, Resman-Rus K, Pavletič M, et al. Inflammatory Immune Responses in Patients with Tick-Borne Encephalitis: Dynamics and Association with the Outcome of the Disease. *Microorganisms* 2019;7. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7110514>.
- [225] Viktória Čabanová, Jana Kerlik, Peter Kirschner, Jana Rosochová, Boris Klempa, Monika Sláviková ML. Co-Circulation of West Nile, Usutu, and Tick-Borne Encephalitis Viruses in the Same Area: A Great Challenge for Diagnostic and Blood and Organ Safety. *Viruses* 2023;15:366. <https://doi.org/10.3390/v15020366>.
- [226] Chan K. R., Ismail A. A., Thergarajan G., Raju C. S., Yam H. C., Rishya M. SSD. Serological Cross-Reactivity among Common Flaviviruses. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.975398>.
- [227] Naiken S, Griffiths M, Hurdial JR, Narainapoulle S, Honess P. Reference intervals for biochemical and haematological analytes of juvenile captive-bred long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) from Mauritius with examination of the effects of individual characteristics using principal component analysis. *J of Medical Primatology* 2016;45:277–89. <https://doi.org/10.1111/jmp.12224>.